

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA FASE I DE COMPOSTAGEM E DA
ESTERILIZAÇÃO DO COMPOSTO NO CULTIVO DE DUAS
LINHAGENS DO *Pleurotus ostreatus* var. Florida.**

ANDRÉ RICARDO ZANON

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu
para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
(Energia na Agricultura)

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA FASE I DE COMPOSTAGEM E DA
ESTERILIZAÇÃO DO COMPOSTO NO CULTIVO DE DUAS
LINHAGENS DO *Pleurotus ostreatus* var. Florida.**

ANDRÉ RICARDO ZANON

Orientadora: Prof^a. Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu
para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
(Energia na Agricultura)

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO- BOTUCATU (SP)

Z33I Zanon, André Ricardo, 1985-
Influência da fase I de compostagem e da esterilização do composto no cultivo de duas linhagens do *Pleurotus ostreatus* var. Florida / André Ricardo Zanon. - Botucatu : [s.n.], 2015
xi, 71 f. : ils. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minihoni
Inclui bibliografia

1. Cogumelos - Cultivo. 2. Pasteurização. 3. Bagaço de cana. 4. Cama de galinha. 5. Substratos. 6. Compostagem. I. Minihoni, Marli Teixeira de Almeida. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INFLUÊNCIA DA FASE I DE COMPOSTAGEM E DA ESTERILIZAÇÃO
DO COMPOSTO NO CULTIVO DE DUAS LINHAGENS DO *Pleurotus
ostreatus* var. *Flórida*"

ALUNO: ANDRÉ RICARDO ZANON

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

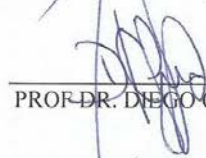
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROFA. DRA. MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE



PROF. DR. DIEGO CUNHA ZIED

Data da Realização: 08 de janeiro de 2015.

Dedico

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni pela orientação e amizade.

Aos amigos do módulo de cogumelos Meire C. N. Andrade, Fabrício R. Vieira, João P. Furlan Jesus, Dênis Nakacima, Stefany Viana e Ivando R. Fogaça (Grilo) pelo companheirismo e ajuda durante todos os procedimentos.

À amiga e técnica do laboratório de bromatologia da FMVZ, Gisele Setznagl, pelas análises e pelo ensinamento.

Aos amigos Guilherme Oguri e Giulia Caterina pelo companheirismo, apoio e ajuda com muitas informações.

À minha noiva Marina pela ajuda com as traduções, revisões e principalmente à paciência desprendida.

A todos os funcionários da Fazenda Lageado da FCA/UNESP, que de alguma forma colaboraram para tornar possível este trabalho.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em energia na agricultura da FCA, Adriano Wagner Ballarin, por toda atenção desprendida durante o período do mestrado.

À CAPES pelo auxílio da bolsa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Cogumelos no Brasil e no mundo	7
2.2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
2.3. Matérias-primas utilizadas no cultivo de cogumelos	9
2.4. Fases I e II (compostagem, pasteurização e condicionamento) e esterilização para <i>P. ostreatus</i> var. Florida.....	10
2.5. Cultivo	12
2.6. Nutrição de cogumelos	13
2.7. Estruturas lignocelulósicas	15
2.8. Degradação da lignina, celulose e hemicelulose	17
2.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Inóculos	21
3.1.1. Matriz primária	21
3.1.2. Matriz secundária	22
3.1.3. Matriz terciária	22
3.1.4. Semente ou “spawn”	23
3.2. Composto.....	23
3.2.1. Procedência dos ingredientes e formulação do composto	23

3.2.2. Pré-umedecimento da palha.....	24
3.2.3. Mistura dos ingredientes e compostagem (Fase I)	25
3.2.4. Pasteurização, condicionamento (Fase II) e esterilização	27
3.3. Fase III (inoculação, colonização e cultivo).....	28
3.4. Cronograma de atividades	29
3.5. Parâmetros avaliados	30
3.5.1. Relativos ao composto e matérias-primas desse.....	30
3.5.1.1. Umidade e índice pH	31
3.5.1.2. Perda de massa fresca (pmf) e perda de massa seca (pms)	31
3.5.1.3. Análises físico-químicas.....	32
3.5.1.3.1. Relação C/N.....	32
3.5.1.3.2. Proteína bruta (PB)	33
3.5.1.3.3. Cinzas	33
3.5.1.3.4. Lignina, celulose e hemicelulose.....	33
3.5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.5.2. Relativos à produção	34
3.5.2.1. Período de incubação.....	34
3.5.2.2. Número e massa dos basidiomas	34
3.5.2.3. Produtividade.....	35
3.5.2.4. Eficiência biológica	35
3.5.3. Relativos ao ambiente de cultivo.....	36
3.6. Análises estatísticas	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Parâmetros avaliados	37
4.1.1. Relativos ao composto e matérias-primas desses.....	37
4.1.1.1. Umidade e índice pH	37

4.1.1.2. Perda de massa fresca (pmf) e perda de massa seca (pms)	40
4.1.1.3. Análises físico-químicas	43
4.1.1.3.1. Relação C/N e proteína bruta (PB)	43
4.1.1.3.2. Cinzas	46
4.1.1.3.3. Lignina, celulose e hemicelulose	47
4.1.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.1.2. Relativos à produção	55
4.1.2.1. Período de incubação, número e massa dos basidiomas.	55
4.1.2.2. Produtividade e eficiência biológica	58
4.1.3. Relativos ao ambiente de cultivo	63
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	65

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Teores de lignina, celulose e hemicelulose na palha de cana	17
Tabela 2. Enzimas envolvidas na degradação da lignina, celulose e hemicelulose	17
Tabela 3. Identificação dos tratamentos utilizados durante o experimento.....	20
Tabela 4. Formulação do composto e características dos materiais utilizados	24
Tabela 5. Dias do início da formação e do pré-umedecimento das medas de palha de cana-de-açúcar e volumes (Litros) de água utilizados de acordo com cada tratamento.	25
Tabela 6. Número de reviradas e tempo de compostagem (Fase I) de acordo com os tratamentos.	26
Tabela 7. Cronograma de atividades do experimento	30
Tabela 8. Umidade dos compostos nas etapas do preparo do substrato.....	38
Tabela 9. Índice pH dos compostos nas etapas do preparo do substrato.....	39
Tabela 10. Umidade e índices de pH dos compostos ao final da Fase III.	39
Tabela 11. Teores de proteína bruta (%) no preparo do substrato.....	43
Tabela 12. Relações C/N e teores de proteína bruta (%) nos compostos ao final da Fase III.....	45
Tabela 13. Teores de cinzas (%) no preparo do substrato.	46
Tabela 14. Teores de cinzas nos compostos ao final da Fase III.....	47
Tabela 15. Teores de lignina (%) no preparo do substrato.....	48
Tabela 16. Teores de celulose (%) no preparo do substrato.....	48
Tabela 17. Teores de hemicelulose (%) no preparo do substrato.....	49
Tabela 18. Teores de lignina, celulose e hemicelulose nos compostos ao final da Fase III.....	51

Tabela 19. Médias de período de incubação (dias), número de cachos colhidos por furo e massa média dos cachos (g), em função do tipo de composto e linhagem..... 56

Tabela 20. Eficiência biológica e produtividade das linhagens por fluxo e total da colheita, em função do preparo de composto..... 59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Produção de cogumelos por País em 2012.....	8
Figura 2. Representação das fibras vegetais, adaptado de Santos et al. (2012).....	16
Figura 3. Medas de composto: A (6 dias de compostagem), B (4 dias de compostagem) e C (2 dias de compostagem).	25
Figura 4. Preparo do composto axênico: A - mistura e umidificação da palha de cana, farelo de trigo, gesso e calcário calcítico em betoneira; B – selagem dos sacos de polietileno após adensamento; C – sacos com composto prontos para autoclavagem; D - disposição dos sacos em autoclave vertical.	26
Figura 5. Pesagem do composto após condicionamento.	27
Figura 6. Procedimentos para os compostos pasteurizados. A - inoculação; B- colonização em câmara climatizada; C - sacos alojados na sala de cultivo; D - unidades devidamente identificadas.	28
Figura 7. Procedimentos de inoculação para os tratamentos T7 e T8: A – disposição dos sacos no interior de câmara fluxo laminar; B – detalhe do corte da aresta dos sacos plásticos para introdução do inóculo; C – adição do inóculo no composto (20g) ; D – Unidade furada (3 furos), identificadas e alojadas em sala de cultivo.	29
Figura 8. Padrão de tamanho dos cogumelos colhidos.....	35
Figura 9. Perda de massa fresca dos compostos A, B e C na pasteurização e condicionamento. Letras iguais no topo de cada barra indicam que as perdas não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 7,33 e DMS: 1,32.....	40
Figura 10. Perda de massa fresca nos compostos ao final do cultivo (Fase III). Letras iguais no topo de cada barra indicam que estas não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 8,43 e DMS: 3,47.	41

- Figura 11. Perda de massa seca (%) do composto durante a Fase II. Letras iguais no topo de cada barra indicam que não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 28,98 e DMS: 1,47 42
- Figura 12. Relação C/N dos compostos durante seu preparo e ao final do cultivo: A. 6 dias de compostagem; B. 4 dias de compostagem; C. 2 dias de compostagem; D. esterilizado. 44
- Figura 13. Micrografias da palha de cana-de-açúcar *in natura* e ao final da Fase I. Magnitude: A- 800 X, B - 1600X e C - 8000X. 52
- Figura 14. Micrografia da palha de cana-de-açúcar ao final da Fase II (pasteurização e condicionamento). Magnitude: A - 800X, B - 1600X, C - 8000X. 54
- Figura 15. Micrografia da palha de cana-de-açúcar (Substrato D) após esterilização em autoclave (121°C, 1 atm. Por 2 horas). Magnitude: A - 800X, B - 1600X e C - 8000X 55
- Figura 16. Período de incubação por substrato e período de incubação por linhagem. Letras iguais no topo de cada barra indicam que não diferem entre si (Tukey 5%). (1): compostos preparados com a mesma formulação à base de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo, porém, com diferentes tempos de Fase I: A (6 dias), B (4 dias), C (2 dias) e D (axênico). 58
- Figura 17. Colheitas por linhagem e temperaturas diárias registradas. 62

RESUMO

O *Pleurotus ostreatus* var. Florida, chamado popularmente de “shimeji branco”, é um dos cogumelos em expansão no mercado brasileiro devido, principalmente, à rusticidade do cultivo, fator que atrai muitos produtores rurais para esta prática. No Brasil, o método mais utilizado no preparo do substrato de cultivo envolve uma compostagem curta com posterior pasteurização a vapor e condicionamento. Há também, mas em menor escala, o uso de substrato esterilizado no cultivo, o qual é chamado de axênico. A compostagem e a pasteurização utilizadas no Brasil baseiam-se em procedimentos adotados na China, Europa e Estados Unidos, cujo clima e matérias-primas são diferentes. Portanto, são necessárias pesquisas que busquem as melhores maneiras de se conduzir essas etapas da produção de cogumelos, para que se tenham resultados cada vez mais satisfatórios, pesquisas essas que englobam também testes com diferentes linhagens, buscando as que apresentem a maior eficiência biológica e produtividade. Para avaliar a influência de três períodos diferentes de compostagem (6, 4 e 2 dias) e da esterilização (121°C a 1atm por 2 horas) do composto, sobre os parâmetros de produção do cogumelo (eficiência biológica, produtividade, período de incubação, número e peso médio dos cachos colhidos), foi realizado um experimento com 8 tratamentos divididos em 2 grupos: pasteurizado (T1 a T6) x axênico (T7 e T8). Para isso foi utilizado uma formulação de composto à base de palha de cana-de-açúcar suplementada com farelo de trigo e duas linhagens do *P. ostreatus* var. Flórida (POS 09/101 e POS 13/001). Tal avaliação foi efetuada relacionando resultados de análises químicas (relação C/N, lignina, celulose, hemicelulose, proteína

bruta e cinzas) e físicas (perda de massa fresca e seca e micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura) do composto, coletadas ao longo das etapas de obtenção do composto de cultivo e do composto exaurido. Os tratamentos T2 e T4, obtidos por diferentes tempos de Fase I (6 e 4 dias) com uso da linhagem POS 09/101 apresentaram os melhores resultados de eficiência biológica (T2=108,91% e T4=102,49%) e produtividade (T2=26,22% e T4=25,72%). Essa linhagem apresentou tais resultados porque apontou maior consumo de massa fresca do composto durante o cultivo, menor período de incubação e maior número de cogumelos colhidos. Os tratamentos T7 e T8, obtidos por via axênica, apresentaram resultados menos satisfatórios de eficiência biológica (T7=77,36% e T8=82,81%) e produtividade (T7=22,02% e T8=23,34%) quando comparados aos resultados obtidos pelo tratamento 2. Os compostos com 4 e 6 dias de compostagem apresentaram melhores resultados devido principalmente à menor relação C/N (47 e 46) e à maior concentração de proteína bruta (6,61% e 6,52%) disponíveis ao cogumelo ao final da Fase II. Esses dois períodos de compostagem também influenciaram no consumo de celulose e hemicelulose pelo cogumelo durante a Fase III, pois apresentaram para as duas linhagens teores significativamente menores para esses nutrientes no composto exaurido em relação ao composto ao final da Fase II. Além disso, os cogumelos obtidos por via axênica apresentaram peso médio dos cachos (POS 09/101: 40,15g e POS 13/001:36,92g) inferior em relação aos cogumelos obtidos por via de compostagem e pasteurização. Portanto, o período de compostagem e a via de obtenção do composto (axênico x compostagem seguida de pasteurização) para este experimento influenciaram na produtividade e na eficiência biológica da linhagem POS 09/101.

Palavras chave: Cogumelo; eficiência biológica; shimeji; pasteurização; cana-de-açúcar.

INFLUENCE OF COMPOSTING PHASE I AND STERILIZATION OF COMPOUND IN TWO *Pleurotus ostreatus* Var. Florida LINEAGES CULTIVATION. Botucatu, 2015.71p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ANDRÉ RICARDO ZANON

Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

SUMMARY

Pleurotus ostreatus Var. Florida, currently known as “white shimeji”, is a variety of mushroom that is expanding in Brazilian market mainly owing to its rustic characteristics of cultivation in small and taken areas, factors which attract many farmers for this practice. In Brazil, the short composting with subsequent steam pasteurization and conditioning is the widely used method to obtain the cultivation substrate. There is also another cultivation, although on a small scale, made by aseptic ways which is called “axenic culture”. The composting and pasteurization used nowadays are based on procedures employed in China, Europe and United States of America, which weather and raw material are different. Therefore it is necessary to make researches that show best ways to manage these stages of mushrooms production in order to obtain more satisfactory results – which embody likewise tests with different lineages looking for those one that present higher biological and productivity efficiency. Assessing the influence of three different composting cycles (6, 4 and 2 days) and compound sterilization (121°C/1atm for 2 hours) on the production patterns of mushroom (biological efficiency, productivity, incubation period, number and average weight of the bunches collected) it was done an experiment at the mushroom department at Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu, which consists of 8 treatments divided into 2 groups: pasteurization (T1 to T6) x axenic (T7 and T8). For this experiment we used a variety of compound consisting of sugarcane straw supplemented with wheat bran and two lineages of *Pleurotus ostreatus* Var. Florida (POS 09/101 and POS 13/001). This assessment was made by relating chemical (relation C/N, lignin, cellulose, hemicellulose, raw protein and mineral matter) and physical (loss of fresh and dry mass and micrograph obtained by scanning electron microscopy) analysis results of the compound, which were collected alongside the stages of obtainment of the cultivation substrate and the drain substrate. Treatments 2 and 4, achieved in different

times of Phase I (6 and 4 days, respectively) and the same lineage (POS 09/101) presented best results related to biological efficiency (T2=108,91% and T4=102,49%, respectively) and productivity (T2=26,22% and T4=25,72 %). This lineage presented results that show higher consumption of fresh mass during the cultivation, shorter incubation period and higher number of harvested mushrooms. Treatments 7 and 8, obtained by aseptic ways, presented less satisfactory results for biological efficiency (T7=77,36% and T8=82,81%) and productivity (T7=22,02% and T8=23,34%) when compared to the results achieved in treatment 2. Compounds with 4 and 6 days of composting presented best results mainly owing to the lower C/N relation (47 and 46) and higher amount of crude protein (6,61% and 6,52%) in mushrooms at the end of Phase II. These two periods of composting also has influenced on the mushroom cellulose and hemicellulose consumption during Phase III, since both lineages presented levels significantly lower for these nutrients in drained compound respecting the compound at the end of Phase II. Moreover, the mushrooms obtained by axenic culture presented an average weight of the bunches (POS 09/101: 39,16g and POS 13/001: 36,34g) which are inferiors when compared to the mushrooms obtained by composting and pasteurization. Hence, the time of composting and the obtainment way of the compound for this experiment influenced on the productivity and on the biological efficiency of the lineage POS 09/101.

Keywords: Oyster mushroom; biological efficiency; sugar cane; productivity; pasteurization.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos comestíveis no Brasil vem crescendo à medida que passa a ser conhecido pela população quanto à qualidade e o potencial gastronômico desses produtos *in natura*. O cogumelo “Champignon” (*Agaricus bisporus*) é o mais consumido nacionalmente, principalmente devido ao fato de ser ingrediente em pratos já tradicionais, como o *strogonoff* e o molho madeira, e pela conveniência do varejo na forma de conservas. Porém, a experimentação de outros cogumelos, como o shiitake (*Lentinula edodes*), o shimeji (*Pleurotus ostreatus*) e até o próprio “Champignon” em suas formas naturais, vem tomando força e mercado. Com uma crescente demanda, a oferta terá que aumentar e, para isso, os produtores – principalmente os de agricultura familiar – deverão explorar diversas fontes de carbono, como os subprodutos da agroindústria, de forma a diminuir custos e otimizar os resultados. Restos lignocelulósicos de culturas locais poderão ser utilizados na produção ainda que possam não apresentar a mesma produtividade registrada por fontes já consagradas, como a palha de arroz e a de trigo utilizadas com conhecimento proveniente do exterior, pelo menos poderão ter um custo/benefício melhor devido à economia com o transporte e com a facilidade de aquisição da matéria-prima a preços mais baixos.

O *P. ostreatus*, variedade branca, é um dos cogumelos que está em expansão no mercado brasileiro devido, principalmente, às suas características de cultivo, suportando temperaturas entre 25 e 30°C em instalações rústicas, com o mínimo de controle (umidade e insetos). No Brasil, o método mais utilizado para a obtenção do substrato de cultivo desse cogumelo é através da compostagem curta com posterior pasteurização e condicionamento. Há também, em pequena escala, o cultivo realizado por

vias assépticas, chamado de cultivo axênico, que consiste na esterilização do composto sem que o mesmo tenha que passar pelo processo de compostagem e pasteurização, permitindo, assim, um ciclo de produção mais rápido.

A compostagem e a pasteurização utilizadas atualmente no Brasil baseiam-se em procedimentos adotados na China, Europa e Estados Unidos, cujos clima e matérias-primas são diferentes. Portanto são necessárias pesquisas que demonstrem as melhores maneiras de se conduzir essas etapas da produção de cogumelos para que se tenha resultados satisfatórios. Resultados esses que englobam também testes com diferentes linhagens, buscando as que apresentem a maior eficiência biológica e produtividade, o que mostra, entre outros fatores, estarem adaptadas ao clima nacional.

Todos os estudos que abordam os aspectos de produção de cogumelos, desde testes de matérias-primas, assunto já amplamente abordado nas pesquisas, até processos metabólicos de vias catalíticas envolvidos na biodegradação de lignocelulósicos, assim como a seleção de linhagens, entre outros, são de extrema importância para o desenvolvimento da fungicultura.

Portanto este trabalho teve como objetivo analisar as transformações físico-químicas que ocorrem nos compostos à base de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo, obtidos em diferentes períodos de Fase I de compostagem e por via axênica (esterilização), e correlacioná-las com parâmetros de produção, empregando duas linhagens do cogumelo *P. ostreatus* var. Flórida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cogumelos no Brasil e no mundo

A estrutura do mercado de cogumelos no Brasil tem a base em empresas produtoras de substrato de cultivo e de inóculo, localizadas, principalmente, nas regiões Sudeste e Sul, com destaque para o interior de São Paulo (Mogi das Cruzes e Cabreúva) e Paraná (Castro).

São poucos os produtores que realizam as etapas de compostagem e pasteurização do composto, já que essas envolvem custos elevados, mão de obra especializada e equipamentos adequados que permitam obter um produto de qualidade. Alguns fungicultores adquirem apenas a “semente” do cogumelo de laboratórios especializados e realizam a confecção do substrato, utilizando, para isto, principalmente bagaço de cana, capim braquiária, esterco de galinha ou cama de frango e palha de trigo ou arroz. No entanto, na maioria dos casos são pequenos produtores de champignon, *P. ostreatus* var. Florida e/ou Shiitake, que adquirem o substrato de terceiros já inoculado com o micélio do fungo desejado.

A maioria dos produtores realiza o cultivo de cogumelos em ambientes rústicos não climatizados, estufas construídas de forma simples utilizando madeira, tela de sombreamento 80% e lona dupla face ou material tipo “tetra pak” que, somados à falta de informação técnica, principalmente sobre a importância da correta higiene pessoal e do próprio ambiente de cultivo, diminui a capacidade de produção. Por isso, a forma de produção do substrato não asséptico, que tem seu princípio na atuação de uma microbiota desejável responsável pela transformação do composto durante as fases de

umidificação, compostagem e pasteurização da matéria-prima, deve ser a mais adequada para tal estilo de cultivo. Devido a esse cenário, os produtos oriundos da fungicultura apresentam preços altos. Como exemplo, o *P. ostreatus* var. Flórida é vendido no varejo, em embalagens de 200g, no valor aproximado de R\$ 6,00, ou R\$ 30,00 o kg do produto. Segundo Urben (2004), além do preço e da dificuldade de obtenção do cogumelo, há o problema relacionado ao transporte, uma vez que se trata de um produto altamente perecível e, devido às longas distâncias geralmente percorridas para a compra do mesmo, torna-se necessário que a viagem seja feita em veículos com refrigeração, sendo esses, portanto, fatores que contribuem para a elevação dos custos.

Apesar dos problemas econômicos, somados às barreiras culturais, o consumo de cogumelos pelo brasileiro vem crescendo. Ainda se tem no consumo do cogumelo Champignon em conserva a maior fatia do mercado para esse setor. No entanto, o consumo *in natura* vem ganhando espaço com o aumento da oferta e da demanda, principalmente dos cogumelos *P. ostreatus* (shimeji) e *Lentinula edodes* (shiitake).

O maior produtor de cogumelos e trufas *in natura*, segundo dados de 2012 fornecidos pela FAO (FAOSTAT, 2014), é a China com uma produção registrada de 5.150.000 toneladas, seguida da Itália e dos Estados Unidos (Figura 1).

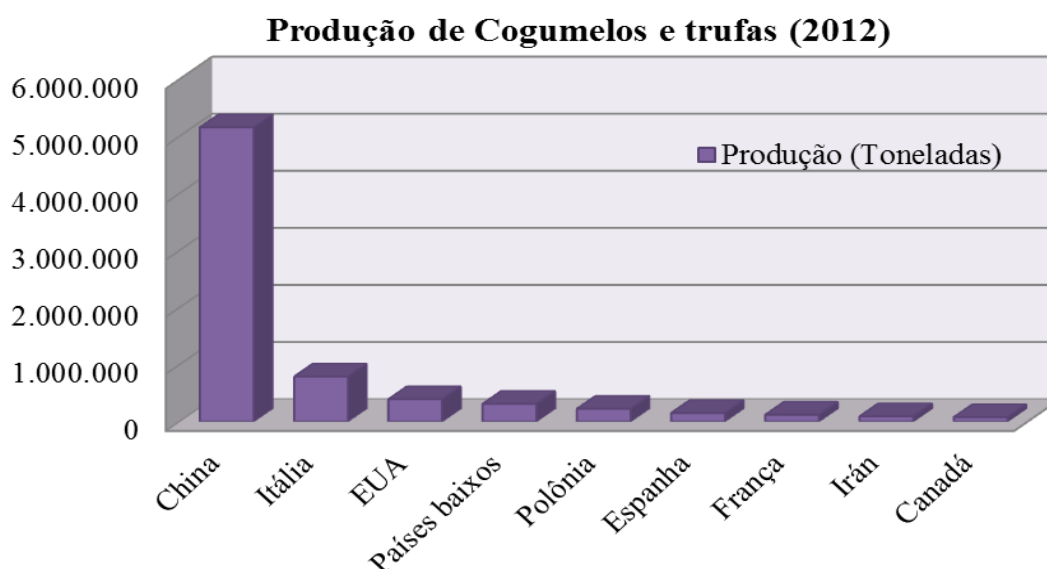


Figura 1. Produção de cogumelos por País em 2012.

Fonte: adaptado de FAOSTAT, 2014.

2.2. *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo *P. ostreatus* é conhecido como sendo um fungo primário na degradação da matéria orgânica lignocelulósica, principalmente da madeira. Essa espécie faz parte dos fungos saprófitos, causadores de podridão branca, e tem como principal característica a capacidade de degradar eficientemente a lignina através da produção e secreção de enzimas, como as oxidases e peroxidases. O gênero *Pleurotus* está inserido na família *Pleurotaceae*, da ordem *Agaricales*, classe dos *Homobasidiomycetes* e divisão *Basidiomycota*. Tem seu nome baseado no fato de o formato do píleo lembrar uma ostra (BALDRIAN et al., 2005).

2.3. Matérias-primas utilizadas no cultivo de cogumelos

Embora comumente a indústria de cogumelos utilize as palhas de arroz e trigo como fonte de carbono para preparar o substrato de cultivo para *P. ostreatus*, esta espécie de cogumelo pode e deve ser cultivada em outras variedades de subprodutos da cadeia agroindustrial e fontes vegetais economicamente viáveis que contenham lignina e celulose (DAS e MUKHERJEE, 2007). Em seu trabalho, esses autores utilizaram diversas culturas tidas como daninhas e que provocam problemas de disposição no ambiente, suplementadas ou não com palha de arroz. O melhor resultado obtido foi para o composto à base de palha de arroz e *Leonotis sp.* (1:1) que apresentou eficiência biológica de 139%. Os autores apontaram como causa de tal resultado a maior retenção de água, promovida principalmente pela palha de arroz.

No Brasil, o uso de bagaço de cana como matéria-prima para produção de cogumelos já está consolidada. Isso é devido à disponibilidade, até o presente momento, desse subproduto por ser fonte de lignina, celulose e hemicelulose, e, também, devido ao fato de ter cerca de 10% de açúcares totais presentes em sua conformação química (PITARELO, 2007). Esses açúcares servem de substrato para uma microbiota inicial no processo de compostagem.

De acordo com Fidalgo e Guimarães (1985), a busca de novas matérias-primas, principalmente daquelas existentes de forma ainda residual em cada região, é de extrema importância, não só para o reaproveitamento de recursos ambientais, mas também para a redução dos custos de produção (transporte) e consequente diminuição dos preços dos cogumelos. Além disso, a técnica pode vir a ser considerada como verdadeiramente sustentável quando é praticada pelo pequeno agricultor a fim de orientá-lo a utilizar insumos da sua própria propriedade para obter o substrato de cultivo. Ainda, o

composto gerado após a produção dos cogumelos pode ser novamente empilhado e adicionado de água para terminar o processo de degradação biológica, podendo ser utilizado com sucesso como adubo e condicionador de solo (COOPER et al., 2010).

Souza (2008) recomenda o preparo do substrato a partir de palhas de gramíneas e bagaço de cana adicionados de farelo de arroz, algodão ou trigo na proporção de 10% em relação ao peso úmido do material lignocelulósico, sendo que a umidade deste último deve estar entre 70 a 75% (umidade também recomendada por Urben, 2004). Quanto mais rico em farelo for o substrato, maior poderá ser a sua produtividade, porém há maiores riscos de contaminação por fungos competidores, sendo o mais comum os do gênero *Trichoderma*, conhecido popularmente como “mofo verde”.

2.4. Fases I e II (compostagem, pasteurização e condicionamento) e esterilização para *P. ostreatus* var. Florida

Por ser um processo biológico, a compostagem requer condições especiais de temperatura, umidade, aeração, pH e relação C/N (NEVES, 2007). A Fase I desse processo é definida como o período em que se realiza a mistura e o umedecimento dos ingredientes, o qual envolve um procedimento pouco controlado em temperatura, realizado apenas com revolvimentos periódicos na pilha de compostagem. As temperaturas nessa fase podem chegar a 80°C dependendo da suplementação (STRAATSMA et al., 1999; EIRA, 2000). Ainda segundo Eira (2000), os procedimentos da Fase I estão condicionados à composição do substrato e à frequência de revolvimentos da meda. Para *P. ostreatus* var. Florida, a formulação inicial do composto obtido por compostagem e pasteurização geralmente apresenta relação C/N variando entre 60 a 90 (VIEIRA, 2012).

Segundo Eira e Minhoni (1997), a superfície da meda possui uma umidade baixa devido ao contato direto com o ar que fornece condições máximas de aerobiose, no entanto, na região central, as condições são quase anaeróbias. Embora a maior parte do metabolismo na compostagem seja devido a fermentações, as transformações ideais ocorrem nas regiões onde predominam condições aeróbias que impedem o estabelecimento de anaeróbios estritos, como bactérias do solo *Clostridium sp.* e *Bacteroides sp.* (UEDA, et al., 2011), razão pela qual o composto deve ser revolvido com frequência, para que as condições sejam homogêneas em todo o material, até o final do tratamento.

Em 1970, Lajolo, em suas pesquisas, relatou que é indispensável se ter um meio ou substrato de cultivo com características físicas e químicas adequadas, para que o micélio do fungo se desenvolva e garanta a produção desejada. Desde então muito se estuda sobre as necessidades nutricionais provenientes do composto para os cogumelos, resultando, assim, em melhores desempenhos de produtividade e eficiência biológica. No entanto, são poucas as pesquisas que relacionam a estrutura física dos materiais lignocelulósicos com a produtividade e eficiência biológica dos cogumelos.

Como exemplos, muitos estudos são realizados para verificar a influência do teor de nitrogênio no composto. Silva et al. (2007) realizaram um experimento com *Pleurotus sajor-caju*, cultivado em substrato obtido a partir de bagaço de cana e *coast-cross*, suplementados com 1%, 2% e 3% de ureia. A suplementação com 2 e 3% inibiu o crescimento do cogumelo, e a com 1% teve a mesma eficiência biológica encontrada quando o composto foi suplementado com 10% de farelo de trigo. Os autores relataram que o enriquecimento do substrato com nitrogênio foi importante para aumentar o teor do mesmo no cogumelo, porém não afetou a produtividade.

Geralmente relações C/N mais estreitas, cerca de 30/1 – obtidas por suplementação com farelos ou palha de trigo e/ou arroz para *Pleurotus* – são utilizadas em cultivos axênicos devido ao fato de passarem por um processo de esterilização seguido de um cultivo asséptico que diminuem os riscos de contaminação. No entanto, se tal procedimento for utilizado para cultivo em estufa com ambiente pouco controlado e não asséptico, os riscos de contaminação são grandes. Por isso, Dias (2010) indica que o melhor método em pequenas propriedades, cuja infraestrutura seja mais rústica, é a obtenção do substrato de cultivo por compostagem curta seguida de pasteurização com vapor e relação C/N mais alta (entre 60 a 90/1), que torna o composto mais protegido de contaminantes prejudiciais ao desenvolvimento do *Pleurotus*, devido à carga microbiana presente no substrato selecionada na pasteurização.

A respeito do aspecto físico do material lignocelulósico para *P. ostreatus*, no momento da inoculação em relação ao seu estado inicial, muito se encontra na literatura referindo-se ao seu estado de “maturação” ou “degradação”, sendo que o desejável ou próximo ao necessário é quando se nota perda da sua resistência e coloração parda. No entanto não há testes físicos aliados aos testes químicos já existentes –como a análise do pH, relação C/N, teor de amônia etc. – para mensurar de forma mais precisa esse

grau de degradação do material vegetal utilizado e transformado no processo de compostagem.

Ali et al. (2007) realizaram um experimento com três espécies de *Pleurotus* (*florida*, *pulmonarius* e *ostreatus*) cultivando-as em substratos com resíduos de algodão. O composto foi preparado imergindo o material lignocelulósico em água por 72 horas, com posterior escorrimento e condicionamento em sacos plásticos de polipropileno contendo 270 gramas cada. Foram testados três métodos de pasteurização ou esterilização: com formol, vapor a 80°C por uma hora e fervura em água por 30 minutos. Os melhores resultados para a massa de cogumelos e a precocidade de colonização do micélio foram obtidos com o método de pasteurização com vapor em todas as espécies utilizadas.

Siqueira et al. (2012) realizaram experimento com *P. ostreatus* cultivado em palha de feijão. O substrato foi obtido por via axênica e através de compostagem curta seguida de pasteurização a vapor. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre a produtividade e eficiência biológica entre os tratamentos. No cultivo axênico, os autores obtiveram uma produtividade de 20,5% e eficiência biológica de 59,52%, enquanto que no cultivo por vias de compostagem e pasteurização obtiveram uma produtividade de 21,08% e eficiência biológica de 61,75%.

2.5. Cultivo

Durante o cultivo de cogumelo *P. ostreatus*, o substrato sofre modificações na sua composição. O grau de degradação pode variar de acordo com a espécie ou a linhagem utilizada aliado às características físicas, químicas e biológicas do substrato e das condições físicas do ambiente de cultivo.

Segundo Souza (2008), as recomendações para o cultivo do *P. ostreatus*, conhecido popularmente como “pleurotus branco” ou “shimeji branco”, é ter-se uma câmara de cultivo dotada de sistema de resfriamento, com piso de cimento que permita limpeza frequente. No entanto, são poucos os produtores que investem em infraestrutura adequada para o cultivo desse cogumelo. No período de incubação, a temperatura ambiental deve permanecer entre 15 a 30°C (sendo a ideal em torno de 25°C), a umidade do ar entre 75 a 95%, ventilação fraca (concentração de CO₂ alta) e ausência de luz. Após o período de incubação – que se completa entre 15 a 30 dias dependendo da temperatura, das condições do substrato e dos fatores genéticos –, deve-se promover um aumento da circulação do ar (isto é, diminuir a concentração de CO₂), manter a

temperatura entre 15 a 28°C e a umidade do ar entre 85 a 95%, além de fornecer luz fraca (500 a 1000 lux) por 12 horas diárias. A seguir, na fase de indução de primórdios, deverá haver uma queda de temperatura de, no mínimo, 5°C no composto (essa queda, na maioria das regiões, ocorre naturalmente com a variação da temperatura entre o dia e a noite) e a temperatura ambiente deverá ser de, no máximo, 28°C, para não ocasionar aborto dos cogumelos.

Segundo Ali et al. (2007), após a colonização do substrato ocorre um aumento na quantidade de nitrogênio em relação ao substrato inicial. Porém, depois da colheita há uma diminuição, o que demonstra que houve um consumo de nitrogênio durante a fase de frutificação dos cogumelos *Pleurotus*.

2.6. Nutrição de cogumelos

Assim como descrito por Miles e Chang (1997), os fungos diferem-se no aspecto nutricional e a degradação do substrato é realizada por uma sucessão de micro-organismos, em que um grupo transforma o meio ao consumir uma parcela dos nutrientes, deixando-o favorável ao crescimento de outro grupo que se alimentará de outra parcela e assim sucessivamente até a degradação total da matéria orgânica.

O gênero *Pleurotus* possui a capacidade de colonizar diversos resíduos lignocelulósicos que geralmente apresentam baixos teores de nitrogênio, tais como: resíduos da cultura do algodão, da indústria têxtil, da indústria sucroalcooleira, da indústria cítrica, da fabricação de celulose, da cultura de cereais (palhas e cascas), dentre outros já estudados (EIRA e MINHONI, 1997). Sobre a necessidade de nitrogênio, Urban (2004) relata que se a relação C/N no substrato de cultivo for menor do que 29:1, isso caracterizaria um excesso desse elemento e, possivelmente, reprimiria a degradação da lignina pelo micélio do cogumelo.

Singh (2000) realizou um experimento testando palha de arroz, palha de trigo e grama como substrato para uma linhagem de *P. sajor-caju*. Os compostos foram submetidos à autoclavagem. A melhor eficiência biológica foi obtida com a palha de arroz (109,3%), além disso, o autor verificou que nesse mesmo tipo de substrato foi maior o consumo de lignina (59,42% - em relação à quantidade presente na matéria-prima) e celulose (31,01%). O maior consumo de lignina foi verificado ao término da fase de colonização, enquanto que o consumo de celulose e hemicelulose ocorreu, principalmente, após essa etapa, ou seja, durante a frutificação dos cogumelos. E para todos os substratos testados a relação C/N estreitou-se, sendo que para a palha de arroz a relação inicial foi de

41/1; após a colonização, foi de 26/1 e no composto exaurido foi de 16/3, tendo, portanto, uma diminuição de aproximadamente 60%.

Segundo Carvalho et al. (2009), a preferência pelo consumo de lignina durante a etapa de colonização pode ser explicada pelo fato de que alguns fungos de decomposição branca – grupo no qual o *P. ostreatus* var. Flórida se insere – promovem um ataque não erosivo na parede celular vegetal. Para isso, os fungos utilizam um complexo sistema, ainda não elucidado totalmente, em que algumas enzimas – como as lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases – promovem a oxidação de compostos fenólicos da lignina. Com a desestruturação da parede celular, torna-se possível a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose.

Vieira et al. (2010a) executaram um experimento testando duas linhagens de *P. ostreatus*: POS 09/101 e POS 09/102. Os autores avaliaram a produtividade e o número de cachos formados nos cogumelos em substrato à base de bagaço de cana e braquiária com e sem suplementação de farelo de trigo. A linhagem POS 09/101 (utilizada no presente experimento) foi a mais produtiva no tratamento suplementado, que apresentou relação C/N inicial de 60/1, com produtividade de 35,02% (base úmida) e número de cachos médio igual a 38,9 contra uma produtividade de 22,29% e número médio de cachos formados igual a 21,1 no tratamento sem suplementação (C/N igual a 90/1), utilizando-se a mesma linhagem. Portanto, o nível de nitrogênio orgânico presente no substrato influenciou na produção dos cogumelos.

Em outro trabalho, Vieira et al. (2010b) analisam a influência da suplementação com o farelo de trigo na palhada de cana-de-açúcar, verificando o crescimento radial do micélio em meio de culturas obtidas por processo de infusão do substrato. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas entre as linhagens POS 09/100 e POS 09/101 para os crescimentos miceliais, os quais também não apresentaram diferenças significativas (ambos analisados pelo teste de Tukey a 5%) entre os meios com e sem suplementação com o farelo de trigo.

No geral, os cogumelos nutrem-se primeiramente de açúcares disponíveis no substrato (carboidratos livres), que compreendem geralmente cerca de 1 a 2% da massa seca. Porém, se o substrato não for esterilizado, ou seja, se estiver sob condições naturais e conter quantidades maiores de açúcares solúveis, outros micro-organismos mesofílicos e termofílicos prevalecerão no meio, impedindo que o micélio do

cogumelo o colonize. Relatam ainda que essa é a principal razão pela qual é preciso cumprir as etapas de compostagem, pasteurização e condicionamento do composto. Assim, ter-se-á no meio de cultivo uma microbiota e um grau de degradação favoráveis ao desenvolvimento do cogumelo que se deseja cultivar (EIRA, 2003; AZEVEDO e ESPÓSITO, 2004; URBEN, 2004).

Menezes e Oliveira (1993) descreveram que as extremidades das hifas dos fungos sintetizam e excretam um grande número de ácidos orgânicos no substrato. Segundo Azevedo e Espósito (2004), alguns compostos – como os monossacarídeos, alguns dissacarídeos, aminoácidos, vitaminas entre outros –, entram na célula do fungo, sem modificações prévias, por distintos mecanismos, porém há compostos – como os trissacarídeos, polissacarídeos, peptídeos e proteínas –, os quais devem ser hidrolisados (digeridos) extracelularmente a um tamanho compatível com a passagem desses nutrientes pela parede e membrana celular antes de atingir o citoplasma onde será metabolizado.

Essas atividades extracelulares são promovidas pela ação de enzimas, as quais podem ser constitutivas e serem sempre secretadas, independente do meio, ou, em outros casos, é necessária a presença de determinado componente para induzir a síntese ou a atividade da enzima para que essa possa realizar seu papel de tornar possível as reações de degradação que resultarão em alimento para o fungo (AZEVEDO e ESPÓSITO, 2004).

Se no substrato de cultivo existir açúcares livres facilmente utilizáveis, como a glicose, o fungo regulará sua síntese de enzimas de forma a direcionar sua nutrição primeiramente ao consumo desses nutrientes, inibindo a transcrição de diversas enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos. Ainda não se sabe ao certo como é realizada tal orientação que leva a transcrição gênica para produzir determinadas enzimas que direcionam o metabolismo, porém, Azevedo e Espósito (2004) relatam que essa regulação seria realizada, em última instância, pela ação de um complexo proteico trimérico chamado HAP, que se une às sequências CCAAT do DNA, promovendo a transcrição de um RNAm.

2.7. Estruturas lignocelulósicas

Como descrito por Santos et. al (2012), a maior fonte de carboidratos encontra-se na biomassa lignocelulósicas. A estrutura da parede celular

vegetal é constituída principalmente de fibras de celulose envoltas por uma matriz amorfa de polioses (hemicelulose) e um material cimentante, a lignina. No entanto, para possibilitar o uso desse recurso ao ser humano, faz-se necessário utilizar as formas de conversões naturais ou artificiais da estrutura física e químicas desses compostos. Para produção de cogumelos, pertencentes geralmente à divisão dos basidiomicetos, o próprio fungo secreta no meio de cultivo enzimas lignocelulolíticas com o intuito de quebrar essas estruturas até transformá-las em monômeros de glicose que possam ser utilizados no metabolismo e, conseqüentemente, no crescimento fúngico.

A Figura 2 apresenta um esquema de como é formada a estrutura da parede celular vegetal a partir do arranjo das fibras celulares.

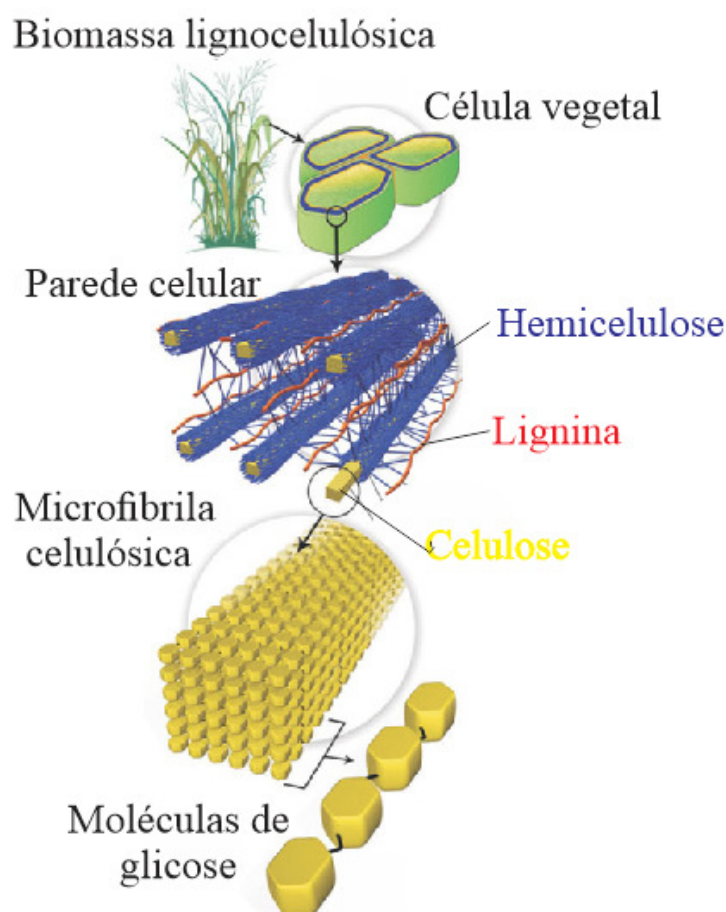


Figura 2. Representação das fibras vegetais, adaptado de Santos et al. (2012).

A proporção dos componentes estruturais da parede celular para a palha de cana, matéria-prima utilizada neste experimento, segundo resultados obtidos por

Pitarelo (2007), utilizando o método de Klanson e a cromatografia dos hidrolisados, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de lignina, celulose e hemicelulose na palha de cana.

Componentes (%)	Palha de cana
Lignina	39,7
Celulose	34,4
Hemicelulose	18,4

Fonte: Pitarelo, 2007

2.8. Degradação da lignina, celulose e hemicelulose

Para colonizar e nutrir-se dos tecidos vegetais, os fungos da degradação branca secretam intensamente metabólitos extracelulares, especialmente enzimas (Tabela 2), que provocam a quebra dos componentes estruturais em moléculas menores, tornando-as aptas para serem transportadas através da membrana plasmática fúngica e participar do metabolismo intracelular (CARVALHO et al. 2009).

Segundo Azevedo e Espósito (2004), existem endo e exoenzimas que atuam sobre o polímero (Tabela 2). As endoenzimas promovem a quebra em oligossacarídeos, o que acarreta em uma redução da viscosidade do substrato. Já as exoenzimas liberam mono ou dissacarídeos. Sinergicamente, com a ação de enzimas capazes de atuar sobre os oligo e/ou dissacarídeos, como a celobiose (duas moléculas de glicose unidas), completa-se a degradação.

Tabela 2. Enzimas envolvidas na degradação da lignina, celulose e hemicelulose.

Enzima	Atuação
Mn – Peroxidases	Lignina
Laccases	Lignina
Peróxido de Hidrogênio	Lignina
Endo-1,4- β -glucanases	Celulose
Exo-1,4- β -glucanases	Celulose
Endo-1,4- β -xylanases	Hemicelulose
Endo-1,4- β -mannanases	Celulose e Hemicelulose
1,4- β -glucosidases	Celulose
1,4- β -xylosidases	Hemicelulose
1,4- β -mannosidases	Celulose e Hemicelulose
1,4- β -cellobiosidases	Celulose

Fonte: Adaptado de Baldrin et al. (2005).

Baldrian et al. (2005) estudaram a degradação de compostos lignocelulósicos da palha de trigo pelo *P. ostreatus* na presença e na ausência de diferentes quantidades de metais como o cobre, manganês, chumbo e zinco. Os resultados obtidos mostraram que as atividades das enzimas extracelulares foram significativamente influenciadas pela quantidade de metais. Por exemplo, a adição de manganês provocou uma redução na atividade das enzimas Manganês peroxidases.

Segundo Straatsma et al. (1999) e Gerrits et al. (1997), o grau de pré-degradação da palha e a degradação do composto para champignon não influenciam no rendimento dos cogumelos, sendo apenas relevante para a quantidade de composto produzido e o teor de amônia, tendo um papel no conteúdo final de matéria seca presente.

Sobre os fungos que promovem a degradação da lignina, celulose e hemicelulose, Melo e Azevedo (2008) relatam que esses podem ser divididos em três grupos conforme o aspecto que o substrato adquire na degradação: fungos de degradação branca, marrom e mole. Os fungos degradadores de materiais lignocelulósicos são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão *Basidiomycotina*.

Os basidiomicetos de degradação branca são os únicos micro-organismos conhecidos que degradam completamente a lignina até CO₂ e água. Eles atacam sinergicamente os três componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) (SÁNCHEZ et al., 2010). Podem ser divididos em dois subgrupos: os que degradam simultaneamente todos os componentes (ataque erosivo) e os que degradam preferencialmente lignina. Os que degradam seletivamente lignina são designados fungos de bolsos brancos ou manchados, cuja habilidade é degradar compostos fenólicos, relacionados à lignina da parede celular, que quase sempre está associada a enzimas extracelulares lignolíticas, em particular as lacases (MELO e AZEVEDO, 2008).

Os fungos da degradação marrom atuam principalmente na porção polissacarídica da madeira, portanto, causam poucas modificações na lignina. Essa parte da lignina não degradada é responsável, segundo Garbosa et al. (2007), pela coloração escura proporcionada. Além disso, tal grupo também pertence aos *Basidiomycetes* e a maioria das espécies à família *Polyporaceae*. Esses fungos promovem porosidade e erosão nas paredes das células dos vegetais em decomposição e têm suas hifas divididas em dois grupos fisiológicos: as que degradam todos os componentes celular da madeira, incluindo a lignina, em diferentes proporções e as que podem somente modificar a lignina quando estão degradando os polissacarídeos da madeira (MELO e AZEVEDO, 2008).

Os fungos da degradação mole são fungos pertencentes às divisões *Ascomycota* e *Deuteromycota*, que podem causar um tipo específico de degradação nos resíduos vegetais caracterizada por ser suave, de aparência úmida, embora, sob condições de secagem, pode lembrar a degradação do tipo marrom. Esses fungos têm preferência por colonizar madeiras duras, especialmente as de alta umidade. Quando em madeira mole, apresentam uma velocidade de degradação menor que a dos fungos de degradação branca e marrom (MELO e AZEVEDO, 2008).

2.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Aguiar e Ferraz (2011) acreditam que duas das chaves para o entendimento sobre o metabolismo celular fúngico e, conseqüentemente, sobre a biodegradação de compostos lignocelulósicos é a observação do processo de colonização e as transformações físicas dos materiais, sendo a microscopia eletrônica de varredura um dos métodos com potencial para este fim. Já se sabe que no processo de colonização as hifas rompem a estrutura da parede celular e invadem o lúmen das células de origem vegetal através da produção de metabólitos endo e extracelulares que participam da quebra da lignina, celulose e hemicelulose, entre outros até a obtenção de monômeros que podem ser utilizados no metabolismo do fungo.

A utilização da microscopia eletrônica de varredura para a visualização de transformações físicas da superfície de materiais lignocelulósicos tem sido aplicada em diversos trabalhos, como o de Lopes et al. (2011), que utilizou tal recurso para comparar fibras de curauá tratadas ou não pelo método de acetilação, e o de Miléo et al. (2011), que estudou as mudanças físicas nas estruturas das fibras vegetais da palha de cana ao longo do processo de deslignificação alcalina.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizaram essa tecnologia para estudar a degradação dos materiais palhosos durante as fases de preparo do substrato para cogumelos. No entanto, o uso da microscopia eletrônica de varredura aparenta ser um importante instrumento que pode ajudar no entendimento das transformações físicas que a palha sofre ao longo dos processos de compostagem e pasteurização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações do Módulo de Cogumelos da FCA/UNESP, Botucatu – cidade localizada no Estado de São Paulo, latitude -22,88° e longitude -48,44° (IBGE, 2012) –, pertencente ao Departamento de Proteção Vegetal, e foi constituído de 8 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos tratamentos utilizados durante o experimento.

Tratamento ⁽¹⁾	Linhagem ⁽²⁾	Dias de compostagem
T1	POS 13/001	6
T2	POS 09/101	6
T3	POS 13/001	4
T4	POS 09/101	4
T5	POS 13/001	2
T6	POS 09/101	2
T7	POS 13/001	0 (Axênico)
T8	POS 09/101	0 (Axênico)

(1) O experimento constou de 4 períodos de compostagem e 2 linhagens (POS 13/001 e POS 09/101). Delineamento experimental em esquema fatorial $2 \times 4 = 8$ tratamentos. Todos os tratamentos utilizaram a mesma formulação de composto à base de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo com relação C/N inicial de 66/1.

(2) POS 13/001 (linhagem obtida do comércio) e POS 09/101 (linhagem pertencente ao banco de linhagens do Módulo de Cogumelos).

Foram preparados 3 compostos com formulações iguais, os quais foram submetidos a períodos variados de compostagem seguidos de pasteurização a vapor e condicionamento. Um quarto composto, de formulação idêntica aos anteriores, também

foi preparado, porém foi submetido à esterilização. As variáveis impostas aos tratamentos T1 a T6 foram: dias de compostagem (6, 4 e 2 dias) e duas linhagens do fungo *Pleurotus ostreatus* var. Flórida (POS 13/001 e POS 09/101); para os tratamentos T7 e T8 foram utilizadas as mesmas linhagens de *P. ostreatus* var. Florida, porém o tratamento térmico do substrato foi calor úmido sob pressão (esterilização).

Para a formulação dos compostos, utilizou-se palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), pré-umedecida durante 3 dias, e farelo de trigo. Para os tratamentos de T1 a T6, no final da compostagem (Fase I), o composto foi submetido ao tratamento térmico de pasteurização e condicionamento (Fase II). Para os tratamentos T7 e T8, após o umedecimento da palha de cana e a mistura com o farelo de trigo, gesso e calcário calcítico, o composto foi condicionado em sacos de polipropileno dotados de filtro e submetido à esterilização em autoclave (121°C e 1 atm por 2 horas), seguindo procedimento proposto por Siqueira et al. (2012).

Após a Fase II e o resfriamento do substrato, foi realizada a inoculação para os tratamentos de T1 a T6, de forma manual, condicionando-se o substrato e a “semente” em sacos pretos de polietileno previamente furados (24 furos de 7mm de diâmetro). Para os tratamentos T7 e T8, após esterilização e resfriamento do substrato, foi feita a inoculação em câmara de fluxo laminar. Todas as unidades foram incubadas por 12 dias em câmara climatizada (25°C) até completar a colonização. Em seguida as mesmas foram alojadas em casa de cultivo com ambiente semicontrolado, onde se monitorou a temperatura e umidade internas.

Para os tratamentos T7 e T8, no momento do alojamento, foram feitos 3 furos com aproximadamente 7mm de diâmetro, em zigue-zague, na superfície de uma das faces do plástico. Teve-se o cuidado para que o furo ficasse rente ao substrato colonizado a fim de evitar que os cogumelos frutificassem no interior dos pacotes.

3.1. Inóculos

3.1.1. Matriz primária

A linhagem POS 13/001 foi adquirida do comércio da região de Jundiaí/SP na forma de “semente”, pronta para uso, colonizada em grãos de trigo. A linhagem POS 09/101 foi proveniente do banco de linhagens do Módulo de Cogumelos, a qual foi isolada a partir de um basidiomas obtido na cidade de São Pedro/SP no ano de 2009. Esta última foi mantida em placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata

Dextrose Ágar), a 5°C, com repiques periódicos. Antes da repicagem para a confecção das matrizes secundárias, a matriz primária foi deixada em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por cerca de 5 horas.

3.1.2. Matriz secundária

No interior de uma câmara tipo fluxo laminar, discos de meio de cultura com micélio, de aproximadamente 6 mm de diâmetro da periferia das colônias das matrizes primárias, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura à base de composto e ágar.

Para o preparo deste meio de cultura coletou-se uma amostra de 60g de palha de cana-de-açúcar suplementada com farelo de trigo. Essa amostra foi adicionada de 700ml de água destilada e ferveu-se por 15 minutos. Em seguida, filtrou-se em peneira plástica de malha fina, de uso doméstico. O extrato foi colocado em um frasco de Duran (capacidade de 1000ml). Completou-se o volume para 1000ml com adição de água destilada e adicionou-se 15g de ágar. Efetuou-se o processo de tinalização, isto é, o processo de duas autoclavagens consecutivas a 121°C por 30 minutos e 1 atm, com um intervalo de tempo de 24 horas. O meio foi resfriado para $45 - 50^\circ\text{C}$ e, posteriormente, vertido (aproximadamente 20ml) em placas de Petri (adaptado de KOPYTOWSKI FILHO, 2006).

Acondicionaram-se as placas inoculadas em estufa a $24 - 28^\circ\text{C}$ durante 7 dias, prazo em que o micélio colonizou cerca de $\frac{3}{4}$ do meio de cultura.

3.1.3. Matriz terciária

O substrato para crescimento das matrizes terciárias foi à base de grãos de trigo. Para o preparo desse substrato, os grãos de trigo foram inicialmente cozidos por 40 minutos em água. Após escoamento do excesso de água e do resfriamento, adicionou-se aos grãos 1% de sulfato de cálcio e 1,5% de calcário calcítico, ambos em relação ao peso úmido dos grãos, os quais foram misturados em betoneira por aproximadamente 10 minutos. O substrato foi colocado em potes de vidro, tipo “azeitona”, de 500ml até preencher $\frac{3}{4}$ do volume dos mesmos. Posteriormente os potes foram fechados com suas respectivas tampas metálicas providas de papel de filtro na parte interna, com o cuidado de não rosquear até o final como medida de segurança contra estouro durante o

tratamento térmico. Os potes com o substrato foram esterilizados a 121°C por 2 horas em autoclave (MINHONI e ZIED, 2008; KOPYTOWSKI FILHO, 2006).

A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar. Para isso, seccionou-se com bisturi o meio de cultura à base de extrato de composto e ágar, já colonizado pelo micélio do fungo, em aproximadamente 8 fatias triangulares. Em seguida, colocou-se uma fatia, com o micélio voltado para cima, no fundo de um pote de vidro previamente esterilizado e vazio. Preenchendo-se $\frac{3}{4}$ do volume do pote com os grãos de trigo esterilizados que, posteriormente, foi fechado com tampa metálica provida de filtro. Os potes inoculados foram mantidos em estufa a 24 – 28°C, na ausência de luz, durante 15 dias.

3.1.4. “Semente” ou *spawn*.

A matriz terciária serviu de inóculo para a produção da “semente” ou *spawn*, o qual, por sua vez, foi utilizado como inóculo para os substratos de cultivo. Para tanto, em câmara tipo fluxo laminar, foram transferidos aproximadamente 30g da matriz terciária para cerca de 1000g de grãos de trigo, sendo que o procedimento de preparo dos grãos foi igual ao da obtenção da matriz terciária, com a diferença de os grãos estarem condicionados em sacos de PEAD (polietileno de alta densidade) semitransparentes dotados de filtro ao invés de potes de vidro.

Os sacos inoculados foram mantidos em estufa a 24 – 28°C durante 15 dias. Prazo em que o fungo completou a colonização do substrato.

3.2. Composto

3.2.1. Procedência dos ingredientes e formulação do composto

A palha de cana-de-açúcar foi adquirida na forma de fardos, com aproximadamente 300kg cada, no município de Lençóis Paulista, SP. O farelo de trigo foi proveniente do comércio da cidade de Botucatu, SP.

Foi utilizada uma única formulação de composto para todos os tratamentos. Para os cálculos das quantidades (em kg) da palha de cana-de-açúcar e do farelo de trigo utilizaram-se os pesos na base seca de cada material. A formulação foi estabelecida para se ter uma relação C/N inicial de aproximadamente 66/1. O gesso (CaSO_4) tem a função de controle da umidade, e o calcário calcítico, de garantir um efeito

tampão no controle da acidez. A Tabela 4 indica a quantidade de cada ingrediente utilizado para cada meda de compostagem.

Tabela 4. Formulação do composto e características dos materiais utilizados.

Ingredientes	Massa úmida	Massa seca	C	N	Umidade	Relação C/N	Quantidade
	kg	kg	... g kg ⁻¹ ...		%		%
Palha de cana-de-	190,5	180	480	5	5,5	96	86,5
Farelo de trigo	25,27	23	460	25	9	18	11
Calcário calcítico	3	3	---	---	---	---	1,5
Gesso	2	2	---	---	---	---	1
Carbono inicial	---	96,98	86400	900	---	---	---
Nitrogênio inicial	---	1,48	10580	575	---	---	---
C/N inicial no	---	---	---	---	---	65,75	---

Para realizar os cálculos, foram determinados, antes do pré-umedecimento, a umidade, o teor de Nitrogênio e de Carbono e a relação C/N da palha de cana e do farelo de trigo.

3.2.2. Pré-umedecimento da palha

O período de 3 dias de pré-umedecimento das três medas de palha foi realizado em ambiente coberto com ventilação natural e piso de cimento. Para que coincidisse com a mesma data de entrada para a pasteurização, as medas foram iniciadas em três momentos diferentes (Tabela 5). Cada meda foi utilizada para o desenvolvimento de dois tratamentos distintos, ou seja, com a inoculação de duas linhagens de *P. ostreatus*.

Durante o pré-umedecimento da palha, as medas foram revolvidas manualmente com o auxílio de instrumentos (garfos agrícolas) e adicionadas de água de abastecimento público, quantificada igualmente por um hidrômetro, a cada 24 horas aproximadamente; tal procedimento é feito para promover a aeração e um contato mais homogêneo da palha com a água e, conseqüentemente, um melhor processo de umedecimento daquela.

Tabela 5. Dias do início da formação e do pré-umedecimento das medas de palha de cana-de-açúcar e volumes (Litros) de água utilizados de acordo com cada tratamento.

Dias do experimento	T1 e T2 Meda A	T3 e T4 Meda B	T5 e T6 Meda C
1	800		
2	450		
3	100	800	
4		450	
5		100	800
6			450
7			100

3.2.3. Mistura dos ingredientes e compostagem (Fase I)

O farelo de trigo, juntamente com o calcário calcítico e o gesso, foi adicionado às medas após os períodos de pré-umedecimento. As misturas e remontagens das medas foram realizadas no mesmo local do processo anterior.

As medas foram montadas seguindo as dimensões aproximadas de 1,5m de altura por 1,5m de largura (Figura 3).

Para cada camada de palha suplementada com farelo de trigo foi feito um revolvimento de forma manual entre os ingredientes, com a intenção de promover uma homogeneização do composto.



Figura 3. Medas de composto: A (6 dias de compostagem), B (4 dias de compostagem) e C (2 dias de compostagem).

As leiras foram reviradas a cada 48 horas aproximadamente (Tabela 6). Durante as reviradas, foi adicionada água suficiente até se detectar um escorrimento no chão devido ao excesso. Antes das reviradas, foi medida a temperatura da leira com um termômetro de haste longa para a verificação da ocorrência do processo biológico de fermentação, o qual gera calor.

Tabela 6. Número de reviradas e tempo de compostagem (Fase I) de acordo com os tratamentos.

Medas	Tratamentos	Dias de compostagem	Número de reviradas
A	T1 e T2	6	3
B	T3 e T4	4	2
C	T5 e T6	2	1

Para o composto axênico, que deu origem aos tratamentos T7 e T8, foi utilizada a mesma proporção de palha de cana e farelo de trigo de forma a obter a mesma relação C/N, de aproximadamente 66/1. A palha de cana não foi submetida ao pré-umedecimento. Inicialmente a palha foi triturada para se ter uma mistura adequada com o farelo de trigo, o calcário calcítico e o gesso, bem como um melhor adensamento dos mesmos nos sacos plásticos (PEAD) de cultivo. Para a mistura utilizou-se a betoneira e, neste procedimento, adicionou-se água até se obter uma umidade aproximada de 69% (Figura 4).



Figura 4. Preparo do composto axênico: A - mistura e umidificação da palha de cana, farelo de trigo, gesso e calcário calcítico em betoneira; B – selagem dos sacos de polietileno após adensamento; C – sacos com composto pronto para autoclavagem; D – disposição dos sacos em autoclave vertical.

3.2.4. Pasteurização, condicionamento (Fase II) e esterilização

No décimo dia do experimento, imediatamente após a última revirada de cada meda (final da Fase I de compostagem), os compostos foram acondicionados manualmente em caixas de polipropileno treliçadas, com tara de 1,82kg e dimensões de 56,5cm de comprimento x 46,5cm de largura x 28,5cm de altura (Figura 5).

As caixas foram identificadas de acordo com o composto (A, B ou C) e, posteriormente, alojadas aleatoriamente no interior da câmara de pasteurização e condicionamento tipo Dalsem Mushroom – contêiner de origem holandesa tipo “Reffer” com dimensões de 12m de comprimento x 2,25m de altura x 2m de largura.



Figura 5. Pesagem do composto após condicionamento.

Foi programado, no sistema do software Dalsem Mushroom Projects, versão 20000301.001 e no sistema de controle e automatização VEC 31, o processo de pasteurização a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 8 horas e o condicionamento a $48 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas. Antes e após a etapa de pasteurização seguida de condicionamento aferiu-se a massa de composto em cada caixa (Figura 5).

Durante os processos de pasteurização e condicionamento, foram monitoradas as temperaturas utilizando-se três sensores inseridos diretamente no composto, posicionados a uma mesma altura em relação ao piso da câmara (1,50m), porém em diferentes regiões e aproximadamente equidistantes entre si.

Para o composto axênico, após a mistura e a umidificação dos ingredientes, o mesmo foi colocado em sacos de polietileno resistentes a altas temperaturas, os quais possuíam filtro tipo Tyvek® para permitir trocas gasosas. 1kg de

composto foi adensado e compactado dentro de cada saco e, após o fechamento com a seladora, foram então submetidos à esterilização (121°C e 1 atm por 2 horas) em autoclave (Figura 4).

3.3. Fase III (inoculação, colonização e cultivo)

Após a Fase II (pasteurização e condicionamento), os compostos foram resfriados naturalmente, ainda dentro da câmara Dalsem Mushroom, para 25 a 28°C. Já a inoculação (Figura 6) das linhagens de *P. ostreatus*, veiculado em grãos de trigo colonizados, foi realizada manualmente adicionando-se 2% de “semente” em relação ao peso úmido do substrato. Isso ocorreu ao mesmo tempo em que, com o auxílio de uma balança, o substrato foi sendo pesado e acondicionado em sacos plásticos de polietileno com 24 orifícios de 7mm, distribuídos entre duas circunferências dos sacos aproximadamente equidistantes entre si. As unidades foram de 8 +/- 0,05kg de substrato e promoveu-se uma distribuição aproximadamente uniforme dos 160g (2%) de inóculo pelo substrato de cultivo.



Figura 6. Procedimentos para os compostos pasteurizados. A - inoculação; B - colonização em câmara climatizada; C - sacos alojados na sala de cultivo; D - unidades devidamente identificadas.

Cada tratamento constou de 25 repetições (unidades) devidamente identificadas. Durante os primeiros 12 dias de colonização, essas unidades foram condicionadas no interior de câmaras climatizadas, programadas para 25°C. Posteriormente elas foram dispostas aleatoriamente nas prateleiras de cultivo alojadas no interior de uma sala com piso de cimento, com sistema manual de irrigação realizada 2 vezes ao dia (às 10 e às 16 horas) para a manutenção da umidade, e ventilador (potência de 80W) para o controle de aeração programado, com timer analógico, para funcionar 15 minutos a cada hora.

A inoculação do composto axênico ocorreu após o resfriamento natural dos pacotes para 25°C. Foram feitas 25 unidades de 1kg para cada linhagem utilizada, as quais compuseram os tratamentos T7 e T8. Para isso, em câmara tipo fluxo laminar, foi feito um corte em uma das arestas de cada saco plástico por onde foram adicionados 2% de semente (20g). Posteriormente os sacos foram novamente selados e alojados em sala climatizada (25°C). Ao fim da colonização, realizou-se, em uma das faces maiores de cada pacote, 3 orifícios de 0,7mm em zigue-zague (Figura 7). A seguir, os sacos foram transferidos para a mesma estufa de cultivo onde se encontravam os tratamentos obtidos pelos processos de compostagem seguidos de pasteurização (Figura 6).

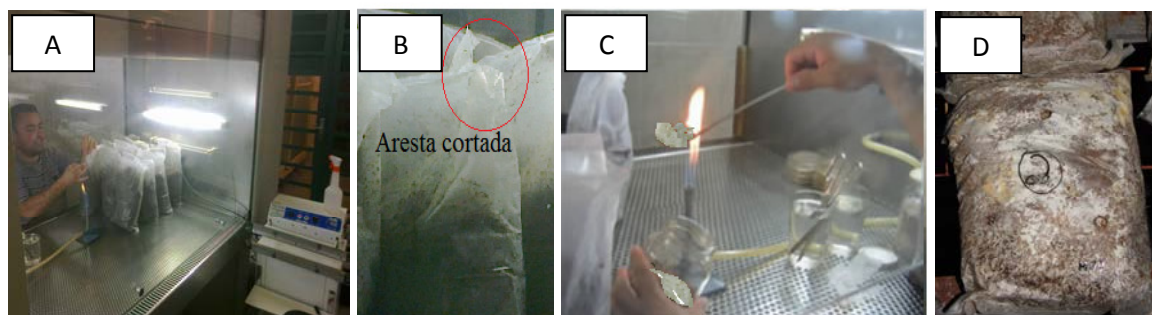


Figura 7. Procedimentos de inoculação para os tratamentos T7 e T8: A – disposição dos sacos no interior de câmara fluxo laminar; B – detalhe do corte da aresta dos sacos plásticos para introdução do inóculo; C – adição do inóculo no composto (20g); D – Unidade furada (3 furos), identificadas e alojadas em sala de cultivo.

3.4. Cronograma de atividades

Na Tabela 7, têm-se as etapas desenvolvidas e a cronologia das atividades.

Tabela 7. Cronograma de atividades do experimento.

Dia	Procedimentos
1	Montagem da meda A e início do pré-umedecimento (T1 e T2)
2	Revirada e adição de água na meda A
3	Montagem da meda B e início do pré-umedecimento (T3 e T4) Revirada e adição de água na meda A
4	Adição de farelo de trigo, gesso e calcário calcítico na meda A e início da compostagem (T1 e T2) Revirada e adição de água na meda B
5	Montagem da meda C e início do pré-umedecimento (T5 e T6) Revirada e adição de água na meda B
6	Adição de farelo de trigo, gesso e calcário calcítico na meda B e início da compostagem (T3 e T4) Revirada e adição de água nas medas A e C
7	Revirada e adição de água na meda C
8	Adição de farelo de trigo, gesso e calcário calcítico na meda C e início da compostagem (T5 e T6) Revirada e adição de água nas medas A e B
10	Pasteurização a $60 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 8 horas, dos compostos A, B e C
11	} Condicionamento a $48 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72 horas, dos compostos A, B e C Mistura e umedecimento da palha de cana, farelo de trigo, gesso e calcário calcítico (composto D). Enchimento dos sacos plásticos e esterilização a 121°C por 2 horas (T7 e T8)
12	
13	
14 15	Inoculação dos compostos e alojamento desses em câmaras climatizadas (25°C), para colonização
27	Deslocamento das unidades para uma sala semicontrolada, para a produção

3.5. Parâmetros avaliados

3.5.1. Relativos ao composto e matérias-primas desse

As amostras analisadas foram compostas por 3 subamostras de aproximadamente 0,3kg cada, coletadas em diferentes pontos das matérias-primas (palha

de cana e farelo de trigo), da palha umedecida (término do pré-umedecimento), do composto (final da Fase I), do substrato de cultivo (final da Fase II) e de cada tratamento da Fase III (final do cultivo).

3.5.1.1. Umidade e índice pH

As umidades foram determinadas baseando-se em procedimentos descritos por Kopytowski Filho (2006). Para isso, foram coletadas 3 amostras compostas de cada etapa do processo. Retirou-se uma alíquota das amostras e condicionou-as em sacos de papel devidamente identificados, os quais tinham a massa conhecida, e posteriormente pesaram-se os pacotes em balança analítica. Transferiram-se as embalagens com seus conteúdos para uma estufa com ventilação forçada e mantida a 65°C por 72 horas (pré-secagem). Após, os pacotes foram pesados e moídos em moinho martelo. Duas alíquotas de cada amostra foram submetidas à secagem em estufa durante 6 horas a 105°C e, então, determinou-se a massa seca dos materiais.

Os cálculos das umidades foram feitos segundo a seguinte equação:

$$U = \left(\frac{M_{fm} - M_{sm}}{M_{fm}} \right) \times 100$$

onde:

U: Umidade do material (%);

M_{fm}: Massa fresca do material (g);

M_{sm}: Massa seca do material (g).

As análises para se determinar os índices pH foram realizadas no laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da UNESP, na FCA.

3.5.1.2. Perda de massa fresca (pmf) e perda de massa seca (pms)

Foram determinadas as perdas de massa fresca durante a Fase II, utilizando-se os pesos dos compostos aferidos ao final da Fase I e ao final da Fase II, e durante o cultivo, utilizando-se os pesos iniciais das unidades (8kg) e os pesos finais aferidos após a produção. Conforme a seguinte equação:

$$PM_{fc} = \left(\frac{M_{fI} - M_{fF}}{M_{fI}} \right) \times 100$$

onde:

PM_{fc} = Perda de massa fresca do composto (%);

M_{fI} = Massa fresca Inicial (kg);

M_{fF} = Massa fresca Final (kg).

As perdas de massa seca na Fase II foram determinadas utilizando-se os pesos secos dos compostos ao término da Fase I e os pesos secos dos mesmos ao final da Fase II. Conforme a seguinte equação:

$$PM_{sc} = \left(\frac{M_{sI} - M_{sF}}{M_{sI}} \right) \times 100$$

onde:

PM_{sc} = Perda de massa seca do composto (%);

M_{sI} = Massa seca Inicial (kg);

M_{sF} = Massa seca Final (kg).

3.5.1.3. Análises físico-químicas

As amostras compostas que foram coletadas em cada etapa do processo, como já descrito no início deste capítulo, após o processo de pré-secagem em estufa (65°C por 72 horas), foram moídas e condicionadas em potes plásticos identificados.

As análises dos teores de Proteína Bruta (PB), Matéria Mineral (MM), Lignina, Celulose e Hemicelulose das amostras foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu.

3.5.1.3.1. Relação C/N

As análises para determinar os teores de carbono e nitrogênio totais foram realizadas no laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da UNESP, na FCA. Para quantificar o nitrogênio, as amostras moídas (3 para cada etapa do processo) tiveram alíquotas submetidas à digestão em ácido sulfúrico com posterior titulação (método

Kjeldahl). Para quantificar o carbono, utilizou-se o método descrito por Gaudette et al. (1974), para isso, alíquotas de cada amostra foram submetidas à digestão em ácido sulfúrico com dicromato de potássio, seguida de titulação com sulfato ferroso para verificar a demanda de dicromato.

3.5.1.3.2. Proteína bruta (PB)

Utilizou-se o método Kjeldahl modificado, que consiste na digestão com aquecimento da amostra em solução digestora à base de sulfato de cobre e dióxido de selênio dissolvido em ácido sulfúrico. Posteriormente a solução resultante foi submetida ao destilador de amônia por arraste, onde há a conversão de nitrogênio em amônia (sulfato de amônio), após alcalinização da mesma com hidróxido de sódio. O vapor resultante do arraste foi recebido em solução de ácido bórico 4%. O teor da amônia foi quantificado por titulação em solução ácida padrão (ácido clorídrico 0,05N). Determinou-se, assim, o teor de nitrogênio total. A proteína bruta das amostras foi estimada multiplicando-se o valor obtido do teor de Nitrogênio total por 6,25 (CAMPOS et al., 2004; GOMES e OLIVEIRA, 2012).

3.5.1.3.3 Cinzas

Foi determinado o teor de Cinzas das amostras através do método de incineração de alíquotas das amostras em mufla a 600°C por 3 horas (CECCHI, 2003).

3.5.1.3.4. Lignina, celulose e hemicelulose

Os teores de lignina, celulose e hemicelulose das amostras foram determinados pelo método utilizado por Van Soeste (1964), Van Soeste e Wine (1968) e Van Soeste et al. (1991), em seus estudos sobre a digestão de compostos lignocelulósicos nos ruminantes. Para isso, foi retirada uma alíquota de cada amostra na qual foi aplicada o método FDN – Fibra Detergente Neutro (lauril sulfato de sódio) para separar a parede celular insolúvel do conteúdo celular solúvel. Na porção FDN foi aplicado o método FDA – Fibra Detergente Ácido (H_2SO_4 - ácido sulfúrico a 72%), para separar a lignina e celulose da quantidade de hemicelulose. A massa de hemicelulose presente nas amostras foi obtida pela diferença entre as massas das porções FDN e FDA (SALMAN et al., 2010).

O teor de lignina foi determinado aplicando-se uma solução de ácido sulfúrico (72%) na porção insolúvel gerada pelo método FDA, para promover a

separação da celulose. Após a secagem em estufa, o conteúdo insolúvel foi queimado a 550°C sobrando apenas minerais e cinzas. Por diferença de peso da amostra antes e depois da incineração, determinou-se a lignina (SALMAN et al., 2010).

A fração de celulose foi obtida subtraindo-se a porção insolúvel do FDA da porção insolúvel (lignina, minerais e cinzas) após a digestão ácida.

Determinou-se o teor de hemicelulose pela diferença entre o resultado da porção insolúvel do método FDN e da porção insolúvel do método FDA.

3.5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram coletadas amostras da palha de cana-de-açúcar (matéria-prima) e do composto (após a Fase I e após a Fase II). Seccionou-se a parte foliar das amostras em quadrados com 1cm de lado. Essas secções receberam um tratamento de deposição de íons de ouro (Au) em câmara de pressão (0,05 a 0,1mbar) (GOLDSTEIN et al., 1992). As amostras metalizadas foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV – 800X, 1600X e 8000X) – equipamento da marca FEI Company, modelo M.E.V. QUANTA 200, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu (CME-IBB/UNESP) – para verificar possíveis mudanças físicas ocorridas no material lignocelulósico.

3.5.2. Relativos à produção

3.5.2.1. Período de incubação

O período de incubação avalia a precocidade das linhagens utilizadas, ou seja, aponta qual linhagem iniciou primeiro a produção. Para produtores esse é um importante instrumento para se determinar a logística de entrada e saída de lotes consecutivos. Por isso foi obtido, a contar do dia em que ocorreu o alojamento das unidades (após o processo de inoculação) na câmara de incubação (climatizada a 25°C) e, posteriormente, na estufa de cultivo (aguardando a formação dos primórdios e o crescimento dos cogumelos), o número de dias que se passaram até o início da primeira colheita dos basidiomas por tratamento.

3.5.2.2. Número e massa dos basidiomas

Foram registrados, diariamente a partir do primeiro dia de colheita, o número e a massa total (utilizando uma balança eletrônica com 0,01g de precisão) dos

basidiomas colhidos. Efetuou-se uma colheita no período da manhã e uma no período da tarde e, neste processo, colhiam-se os cachos que apresentavam a maioria dos píleos entre 2 a 6 cm de diâmetro (Figura 8). Ao final, obteve-se uma média do número de cachos colhidos e da massa média desses cachos por tratamento.



Figura 8. Padrão de tamanho dos cogumelos colhidos.

3.5.2.3 Produtividade

A produtividade (%) foi mensurada por tratamento utilizando-se a seguinte equação (KOPYTOWSKI FILHO, 2006):

$$P = \left(\frac{M_{fb}}{M_{fs}} \right) \times 100$$

onde:

P: Produtividade (%);

Mfb: Massa fresca dos basidiomas (g);

Mfs: Massa fresca do substrato ao início da Fase III (g).

3.5.2.4. Eficiência biológica

A Eficiência Biológica (%) foi mensurada por tratamento, conforme a equação abaixo (KOPYTOWSKI FILHO, 2006):

$$EB = \left(\frac{M_{fb}}{M_{ss}} \right) \times 100$$

onde:

EB: Eficiência Biológica (%);

Mfb: Massa fresca dos basidiomas (g);

Mss: Massa seca do substrato ao início da Fase III (g).

3.5.3. Relativos ao ambiente de cultivo

Registrou-se diariamente, durante os ciclos de colheita, as temperaturas e as umidades relativas máximas e mínimas do interior da sala de cultivo com um termo-higrômetro digital (Incoterm, modelo 7429.02.0.00).

3.6. Análises estatísticas

Os resultados para os períodos de incubação (dias), número de cachos por furo, eficiência biológica, produtividade e análises físicoquímicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias entre as diferentes etapas (início de Fase I, Final de Fase I e Final de Fase II) de preparo dos compostos (A, B, C e D); também foi realizado teste ANOVA com fatorial 4 x 2 (4 compostos x 2 linhagens) para o final da Fase III (término do cultivo). Para isso, foi utilizado o programa de estatística Sisvar 5.0 e o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros avaliados

4.1.1. Relativos ao composto e matérias-primas desses

4.1.1.1. Umidade e índice pH

As umidades dos compostos A, B, C e D em relação a cada etapa do preparo podem ser visualizadas na Tabela 8. Embora todos os compostos tenham apresentado perda de água significativa durante a pasteurização, houve menor perda de água no composto A, com 6 dias de compostagem, para essa etapa (perda de 1,73%). Isso significa que o composto A teve mais água disponível para os cogumelos durante o cultivo. Visualmente o composto C, momentos antes de ser submetido à pasteurização, apresentou mais água livre. Devido a essa água livre, a umidade do composto C ao término da Fase I (78,92%) apresentou diferença estatística em relação ao composto A e B (Tabela 8). Isso indica que no maior tempo de compostagem a palha reteve mais água nas fibras, enquanto que, no menor tempo, parte da água ficou livre e mais suscetível à evaporação durante a Fase II.

O composto D apresentou umidade significativamente menor em relação aos compostos obtidos por compostagem seguida de pasteurização e condicionamento antes e após o processo de esterilização (Tabela 8). Fator esse que pode ser utilizado como argumento para explicar as menores massas dos cogumelos colhidos no composto obtido por via axênica. Porém, esse composto, diferentemente dos outros, não apresentou perdas significativas de umidade antes (69,52%) e após o tratamento térmico (69,46%); fenômeno que era esperado devido à disposição do composto em sacos

plásticos. Segundo Rollan (2003) e Oei (2003), a umidade do composto no momento da inoculação pode variar entre 70% e 80%. Portanto, o composto D foi o único que estava abaixo dessa faixa.

Tabela 8. Umidade dos compostos nas etapas do preparo do substrato.

Composto⁽¹⁾	Etapa				
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II	CV, %	DMS
A	78,09 Aa ⁽²⁾	77,65 Ab	75,92 Ba	0,94	1,82
B	77,06 ABb	77,41 Ab	74,91 Bab	1,12	2,15
C	77,78 Aab	78,92 Aa	73,42 Bb	0,67	1,28
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	69,52 Ac	---	69,46 Ac	0,14	0,22
Média, %	75,61	77,99	73,43		
CV, %	0,46	0,46	1,30		
DMS	0,90	0,92	2,49		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

O comportamento do índice pH foi similar entre as medas de compostagem durante o preparo dos compostos (Tabela 9), aumentando pouco ao final da Fase I em relação ao início e diminuindo pouco após a pasteurização. Esse comportamento é diferente do encontrado por Vieira (2012) em composto à base de bagaço e palha de cana-de-açúcar suplementado com farelo de trigo, em que o valor do pH após a Fase II (7,2) se apresentou maior do que o valor ao final da Fase I (6,6). Isso pode ser devido ao uso do bagaço de cana na formulação do composto no experimento deste autor, pois segundo Kopytowsky Filho (2006), o pH dos compostos durante as Fases I e II é bastante relacionado com a composição dos ingredientes.

O composto D não apresentou alterações significativas para o fator umidade pelo tratamento térmico (Tabela 9). No entanto, esse substrato obtido por via axênica, após a esterilização, estava mais ácido do que os substratos compostados ao término da Fase II. Isso pode ser devido ao menor tempo de contato que as matérias-primas

do substrato axênico tiveram com o calcário calcítico, já que as proporções dos materiais foram as mesmas.

Tabela 9. Índice pH dos compostos nas etapas do preparo do substrato.

Composto ⁽¹⁾	Etapa			CV, %	DMS
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II		
A	6,26 Bab ⁽²⁾	6,80 Ab	6,46 ABa	2,61	0,42
B	6,23 Cb	6,76 Ab	6,50 Ba	1,45	0,23
C	6,73 Aa	6,90 Aa	6,50 Ba	1,31	0,22
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	6,00 Ab	---	5,90 Ab	1,19	0,16
Média, %	6,30	6,81	6,34		
CV, %	2,86	0,42	0,91		
DMS	0,47	0,07	0,15		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

Tabela 10. Umidade e índices pH dos compostos ao final da Fase III.

Composto ⁽¹⁾	Umidade (%)		Índice pH	
	Linhagens		Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101	POS 13/001	POS 09/101
A	58,24 Aa ⁽²⁾	57,68 Aa	4,97 Ab	5,00 Ac
B	50,71 Ab	53,28 Ab	4,87 Bc	5,13 Aab
C	44,88 Bc	52,97 Ab	4,80 Bc	5,07 Abc
D	57,40 Aa	59,10 Aa	5,06 Ba	5,20 Aa
Média, %	54,28		5,01	
CV, %	3,28		0,75	
DMS	4,15 [¥]	3,08 [£]	0,08 [¥]	0,24 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos).

[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens).

CV: Coeficiente de variação.

Ao final da Fase III, observa-se que o composto com maior tempo de compostagem perdeu menos água durante o cultivo, assim como o composto obtido por esterilização (Tabela 10). Possivelmente, se o experimento continuasse por mais dias, esses compostos apresentariam, em relação a tal período, maior produção do

que os compostos com menor umidade. Em relação ao índice pH, esses foram todos menores do que os índices pH encontrados ao final da Fase II. Isso indica que o *P. ostreatus* acidifica o meio que coloniza.

4.1.1.2. Perda de massa fresca (pmf) e perda de massa seca (pms)

Na Figura 9, têm-se as porcentagens de perdas de massa fresca dos compostos, preparados com diferentes tempos de Fase I (A-6, B-4 e C-2 dias), na Fase II.

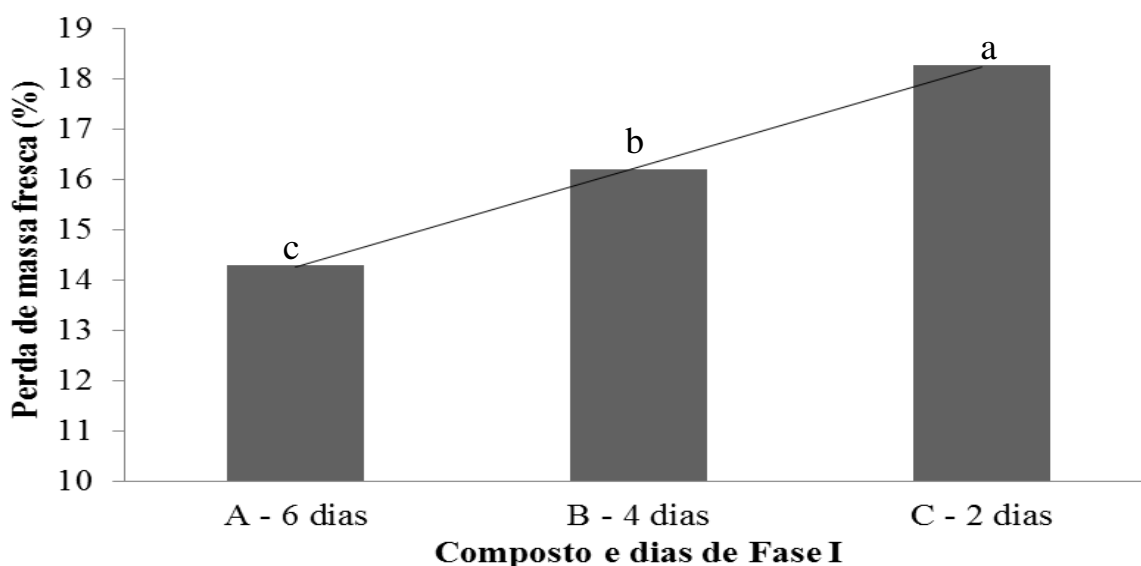
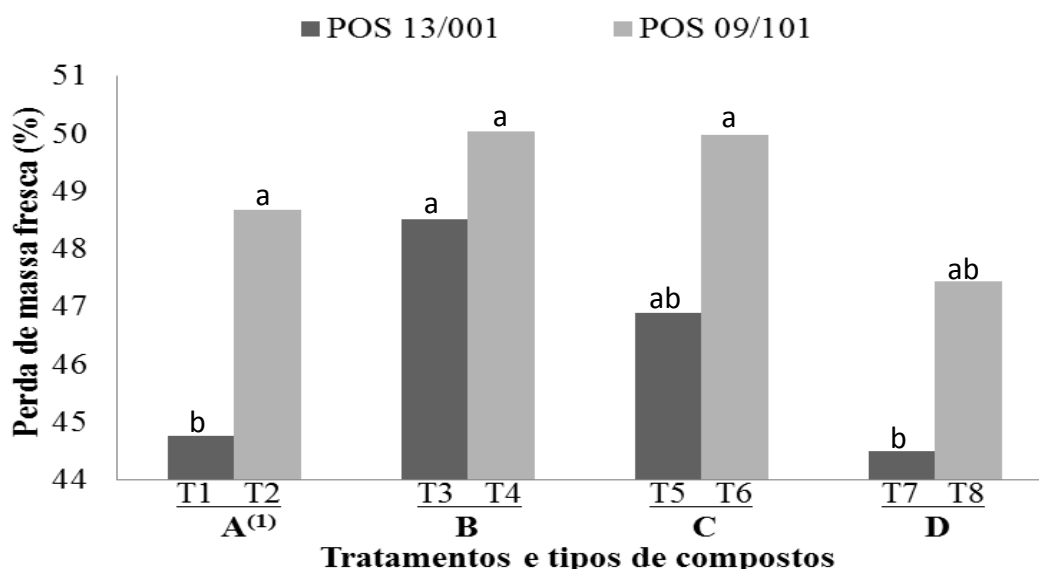


Figura 9. Perda de massa fresca dos compostos A, B e C na pasteurização e no condicionamento. Letras iguais no topo de cada barra indicam que as perdas não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 7,33 e DMS: 1,32.

Os compostos A e B, com maior tempo de compostagem (Fase I), perderam menos massa fresca durante a pasteurização e o condicionamento (Fase II). Essa perda de massa é devida principalmente à evaporação de água do composto. A menor perda registrada no composto submetido à compostagem mais longa é função da maior compactação do material (análise visual) e do menor teor de água livre (não retida pelo material lignocelulósico). Ambos os fatos – compactação e teor de água livre – podem ser explicados pelo maior tempo de atividade microbiana a que foi exposto o composto A, o que garantiu mais maleabilidade à palha, diminuindo o volume da pilha de compostagem e retraindo mais água nas fibras.

Vieira (2012) submeteu compostos formulados com diferentes materiais lignocelulósicos, com ou sem suplementação de farelos, a 7 dias de Fase I

seguido de 8 horas de pasteurização a vapor (59,5°C) e condicionamento de 4 dias (45°C) para experimentação com *P. ostreatus* var. Florida. Seus resultados para perda de massa fresca durante a Fase II indicaram que há influência do tipo de matéria-prima utilizada – decorrente das diferenças nutricionais, dos diferentes aspectos físicos que essas matérias-primas proporcionam ao composto, como maior compactação, e também da suplementação do composto –, pois uma relação C/N mais baixa (composto mais rico em nitrogênio) confere mais atividade microbiana, com maior geração de calor e, conseqüentemente, maior perda de massa fresca. Somando-se a esses resultados, o presente trabalho indicou que o maior tempo de compostagem (Fase I) pode diminuir as perdas de massa fresca do composto durante o tratamento térmico da Fase II.



(1) Compostos preparados com a mesma formulação à base de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo, porém, com diferentes tempos de Fase I: A (6 dias), B (4 dias), C (2 dias) e D (axênico).

Figura 10. Perda de massa fresca nos compostos ao final do cultivo (Fase III). Letras iguais no topo de cada barra indicam que essas não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 8,43 e DMS: 3,47.

Na Figura 10, têm-se as porcentagens médias das perdas de massa fresca encontradas nos tratamentos para a Fase III. Ao final do cultivo (Fase III), todos os compostos apresentaram maior perda de massa fresca com a linhagem POS 09/101 em relação à linhagem POS 13/001, embora a estatística tenha apontado diferença significativa entre as linhagens apenas para o composto A: tratamento 1 com 44,7% de perda e tratamento 2 com 48,7% de perda (Figura 10). Esses resultados ajudam a explicar o

melhor desempenho obtido pela linhagem POS 09/101 em relação à produtividade, pois consumiu mais massa fresca do composto, o que provavelmente refletiu na maior produção de basidiomas.

Segundo Conceição (2010), os fungos produzem enzimas que são responsáveis pela degradação da lignina, celulose e hemicelulose, com o objetivo de utilizar essas moléculas para o seu metabolismo, gerando CO_2 , água e energia como produtos finais. Portanto, a perda de matéria seca do composto na Fase II é devido à ação microbiana com consequente perda de carbono na forma de CO_2 . Ao contrário da massa fresca, observou-se que os compostos com maior tempo de compostagem perdem mais massa seca durante a etapa de pasteurização e condicionamento (Figura 11). Essa constatação pode ser atribuída ao maior tempo dos processos biológicos de degradação sobre os ingredientes, o que também gerou processos físicos (calor) e, assim, tornou o composto com 6 dias de compostagem, ao final da Fase I, mais propício para o desenvolvimento de micro-organismos que são selecionados e predominantes durante a Fase II, como, por exemplo, as actinobactérias (SILVA, 2010). Com isso, a atividade microbiana mais intensa na Fase II conferiu aos compostos A (7,13%), B (5,09%) e C (1,57%) diferenças significativas em relação à perda de massa seca durante a pasteurização e o condicionamento.

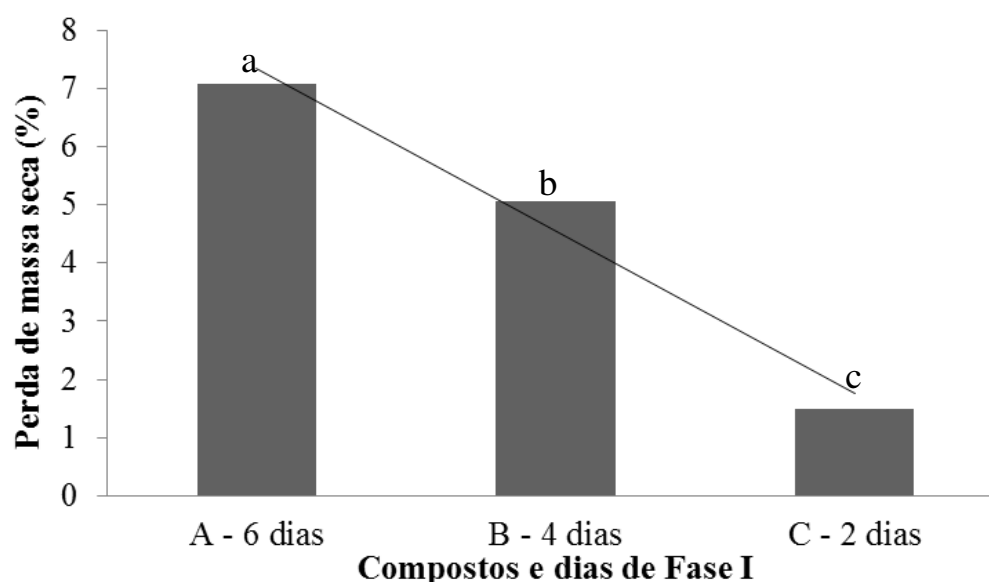


Figura 11. Perda de massa seca (%) do composto durante a Fase II. Letras iguais no topo de cada barra indicam que não diferem entre si (Tukey 5%). CV, %: 28,98 e DMS: 1,47

4.1.1.3. Análises físico-químicas

4.1.1.3.1. Relação C/N e proteína bruta (PB)

Os teores de proteína apresentaram comportamento análogo entre os compostos pasteurizados, aumentando sua participação em massa nas amostras, fator que indica pouco ou nenhum consumo desse nutriente durante as Fases I e II (Tabela 11).

Tabela 11. Teores de proteína bruta (%) no preparo do substrato.

Composto	Etapa			CV, %	DMS
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II		
A	4,17 Cb ⁽¹⁾	5,54 Ba	6,52 Aa	3,67	0,49
B	4,93 Ba	5,18 Bb	6,61 Aa	2,35	0,32
C	3,78 Bb	4,02 Bc	4,59 Ac	3,31	0,34
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	5,07 Aa	---	4,87 Ab	2,38	0,26
Média, %	4,48	4,91	5,65		
CV, %	4,82	1,91	1,78		
DMS	0,56	0,23	0,26		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

O composto A, com maior tempo de compostagem, isto é, maior tempo de atividade microbiana, apresentou aumento significativo no teor de proteína bruta ao final da Fase I (4,17% para 5,54%), enquanto que os compostos B e C, embora tenham tido o mesmo comportamento, não apresentaram tal diferença significativa evidenciada pela estatística (Tabela 11).

O teor de proteína bruta foi significativamente maior no composto submetido a 6 dias de compostagem ao final da Fase I, seguido pelo teor apresentado no composto com 4 dias de compostagem e com menor concentração de proteína bruta para o composto com 2 dias de compostagem. Houve, portanto, uma relação direta entre o maior período de compostagem e a maior concentração de proteína bruta do composto na Fase I. Porém, ao término da Fase II, os compostos A (6,52%) e B (6,61%) igualaram-se, e o composto C (4,59%), com apenas 2 dias de compostagem, manteve-se mais baixo (Tabela 11).

O composto D (axênico), contrariamente aos pasteurizados, apresentou porcentagem menor de proteína bruta após a esterilização, no entanto sem diferenças estatísticas (Tabela 11). Tal fato é devido à inexistência de atividade microbiana no processo axênico.

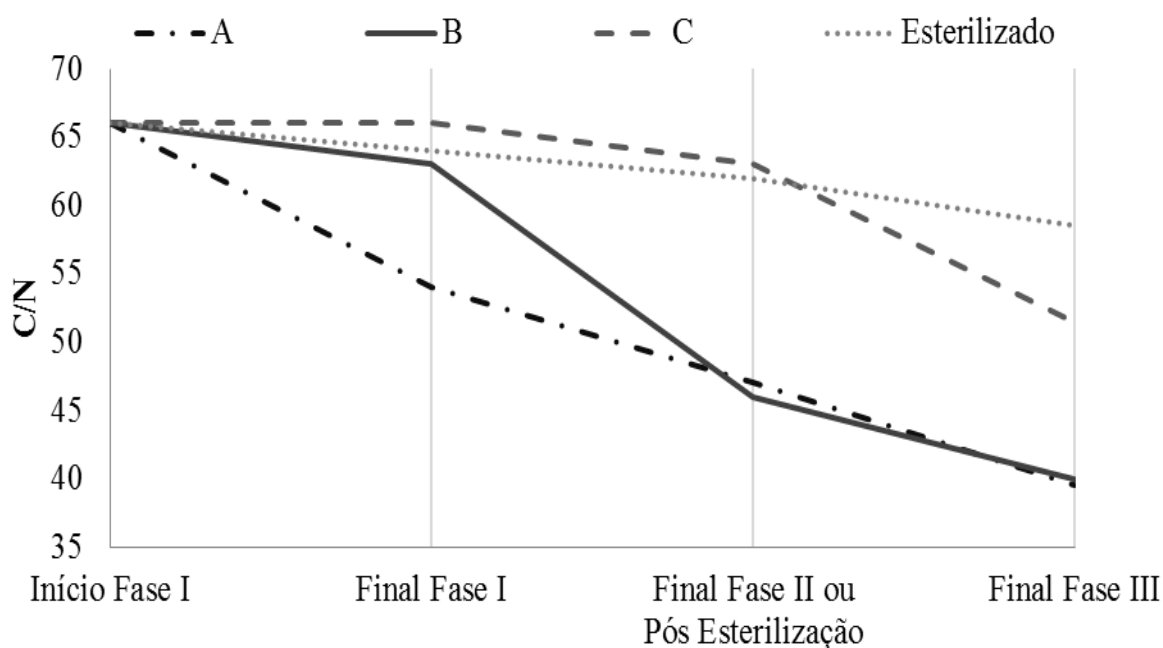


Figura 12. Relação C/N dos compostos durante o preparo e ao final do cultivo: A: 6 dias de compostagem; B: 4 dias de compostagem; C: 2 dias de compostagem; D: esterilizado.

Observando o gráfico da Figura 12 e a Tabela 12, é possível analisar o comportamento das relações C/N dos compostos desde o início da Fase I até o término do cultivo (Fase III). O composto A, com maior tempo de compostagem, ao final da Fase I apresentou a maior redução da relação C/N (66 para 54), seguido do composto B (66 para 63), com tempo de compostagem intermediário, e do composto C (66) que não apresentou alteração. Durante a Fase II, os compostos A, B e C apresentaram redução das relações C/N, porém essa redução foi menor no composto C, obtido por menor tempo de compostagem, fator coerente com o resultado de menor teor para proteína bruta (4,59%) deste composto ao término da Fase II (Tabela 11). Isso indica que no composto C, proporcionalmente em relação aos outros nutrientes, havia menor teor de proteína bruta disponível ao *P. ostreatus* durante o cultivo.

Tabela 12. Relações C/N e teores de proteína bruta (%) nos compostos ao final da Fase III.

Composto ⁽¹⁾	Relação C/N	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	41 Ab ⁽²⁾	38 Ab
B	38 Ab	42 Ab
C	60 Aa	55 Aa
D	57 Aa	58 Aa
Média, %	48,41	
CV, %	6,78	
DMS	7,67 [¥]	5,68 [£]
	Teor de proteína bruta (%)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	5,84 Aa	6,15 Aa
B	6,26 Aa	5,67 Ba
C	4,94 Ab	4,82 Ab
D	4,68 Ab	3,76 Bc
Média, %	5,26	
CV, %	4,06	
DMS	0,50 [¥]	0,37 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos)

[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens)

CV: Coeficiente de variação.

Todos os compostos apresentaram redução das relações C/N ao final da Fase III. Os tratamentos que englobam os compostos com 6 e 4 dias de compostagem, os quais já tinham relação C/N mais estreita ao término da Fase II, para ambas as linhagens, apresentaram a relação C/N significativamente mais baixa ao final do cultivo, conforme pode ser visto na Tabela 12. Tal estreitamento da relação C/N condiz com as maiores concentrações de proteína bruta, também ao término da Fase III, encontrados para os compostos A e B (Tabela 12).

Muitos autores reportam a importância da suplementação dos compostos, independente do modo de preparo (compostagem seguida de pasteurização ou axênico), e relacionam essa suplementação, geralmente feita com farelos de grãos, com o aumento do teor de proteína na mistura conferindo, assim, maior produtividade e eficiência biológica ao *P. ostreatus* (ALANANBEH et al., 2014; FANADZO et al., 2010; VIEIRA et

al., 2010a.; VIEIRA, 2012). Sendo assim, o preparo do composto por via de compostagem seguido de pasteurização e condicionamento pode gerar uma economia em relação ao composto obtido por via de esterilização, pois utilizando a mesma suplementação, devido aos processos biológicos envolvidos no preparo, apresentou maior concentração de proteína bruta ao final da Fase II (compostos A e B) quando comparado ao término da esterilização (composto D).

4.1.1.3.2 Cinzas

O teor de cinzas nos compostos aumentou após as Fases I e II (Tabela 13), resultado coerente com a diminuição dos teores de outros nutrientes, como a hemicelulose. Esse aumento também era esperado devido à presença de materiais contidos na palha de cana inicial considerados inerentes à mesma, assim como indesejados, trazidos do campo de colheita, como a areia. No entanto, o composto D, obtido por via de esterilização, apresentou este comportamento de forma pouco evidente, tendo a participação de matéria mineral praticamente inalterada antes (16,01%) e após (16,14%) o processo de autoclavagem, isso pode ser devido ao fato de a esterilização não envolver processos biológicos de degradação.

Tabela 13. Teores de cinzas (%) no preparo do substrato.

Composto ⁽¹⁾	Etapa				
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II	CV, %	DMS
A	14,85 Bb ⁽²⁾	18,44 Aa	20,50 Aa	5,16	2,31
B	14,10 Cbc	18,42 Ba	22,93 Aa	5,5	2,54
C	12,50 Bc	16,16 Aa	16,64 Ab	8	2,95
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	16,01 Aa	---	16,14 Ab	6,33	2,55
Média, %	7,76	17,67	18,80		
CV, %	1,99	7,73	6,81		
DMS	0,40	3,42	3,34		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

Como era esperada, a participação dos teores de cinzas apresentaram-se maiores ao final da Fase III (Tabela 14). Evidenciando,

proporcionalmente, o maior consumo pelos fungos de outros componentes do substrato. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Sales Campos et al. (2010), os quais também observaram aumento nos teores de cinza ao final do cultivo do *P. ostreatus* em substratos obtidos por diferentes formulações.

Tabela 14. Teores de cinzas nos compostos ao final da Fase III.

Composto ⁽¹⁾	Teores de Cinzas (%)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	32,28 Aa ⁽²⁾	30,33 Aab
B	28,50 Bb	32,88 Aa
C	24,96 Ac	21,73 Bc
D	28,95 Ab	28,16 Ab
Média, %	28,47	
CV, %	4,80	
DMS	3,19 [¥]	2,36 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem respectivamente seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos)

[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens)

CV: Coeficiente de variação.

4.1.1.3.3. Lignina, celulose e hemicelulose

A lignina praticamente manteve-se inalterada após as Fases I e II (Tabela 15). O composto A, por ter sido submetido a um maior tempo de compostagem, apresentou para lignina, ao final da Fase I, 8,40% de participação em massa na amostra, resultado significativamente maior do que a participação da lignina no início da Fase I (7,67%) em amostra desse mesmo composto. Isso pode ser explicado pela redução dos teores de outros nutrientes, como a hemicelulose (Tabela 17), que variou de 31,32% de participação em massa na amostra ao início da Fase I para 27,98% de participação ao final da mesma Fase. A redução de pontos percentuais entre as fases do processo indica o consumo do nutriente, porém o aumento pode indicar que o mesmo foi pouco consumido ou que não foi consumido.

Tabela 15. Teores de lignina (%) no preparo do substrato.

Composto ⁽¹⁾	Etapa				
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II	CV (%)	DMS
A	7,67 Ba ⁽²⁾	8,40 Aa	8,88 Abc	3,44	0,71
B	7,71 Aa	8,17 Aa	8,45 Ac	2,89	0,57
C	7,79 Ba	7,87 Ba	8,94 Ab	2	0,41
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	7,87 Ba	---	9,73 Aa	3,30	0,65
Média (%)	7,76	8,15	9		
CV (%)	1,99	4,18	2,07		
DMS	0,40	0,85	0,48		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

Tabela 16. Teores de celulose (%) no preparo do substrato.

Composto ⁽¹⁾	Etapa				
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II	CV (%)	DMS
A	35,31 Ab ⁽²⁾	34,60 Aab	31,77 Bb	2,8	2,38
B	34,72 Ab	34,53 Ab	33,05 Ab	3,79	3,24
C	37,71 Aa	36,77 Aa	36,83 Aa	1,17	1,08
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	31,84 Bc	---	33,11 Ab	1,57	1,15
Média (%)	34,90	35,30	33,69		
CV (%)	2,21	2,53	2,99		
DMS	2,01	2,23	2,63		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

Houve pouca mudança nos teores de celulose durante o preparo do composto independente do processo adotado (Tabela 16). Apenas ao final da Fase II pode ser observada uma diferença significativa na redução dos teores de celulose no composto submetido ao maior tempo de compostagem por apresentar maior redução no teor de

celulose durante a pasteurização e o condicionamento. Embora estatisticamente os compostos A e B não apresentaram diferenças significativas ao final da Fase II, a comparação entre as médias do teor de celulose do composto A entre o final da Fase I (34,6%) e o final da Fase II (31,77%) apresentou tal discrepância, evidenciando o consumo de celulose.

Paralelamente, o composto D, esterilizado, apresentou diferenças significativas em relação ao teor de celulose antes e após a esterilização, porém, com aumento deste. Tal fato pode ser explicado pela ausência de atividade microbiana no processo axênico, como já reportado anteriormente.

Os compostos A e B, submetidos a 6 e 4 dias de compostagem, respectivamente, apresentaram diferenças estatísticas significativas ao término da Fase I em relação ao início dessa, quanto a mudanças nos teores de hemicelulose ocorridas durante o processo de compostagem (Tabela 17). Já o composto C, com apenas 2 dias de compostagem, diferiu dos demais porque não apresentou essa redução significativa do teor de hemicelulose durante a Fase I. Essa menor redução do teor de hemicelulose pode, também, ser explicada pelo menor tempo em que o composto C ficou exposto à ação microbiana durante a Fase I.

Tabela 17. Teores de hemicelulose (%) no preparo do substrato.

Composto⁽¹⁾	Etapas				
	Início Fase I	Final Fase I	Final Fase II	CV (%)	DMS
A	31,32 Aa ⁽²⁾	27,98 Bb	27,62 Ba	2,22	1,61
B	32,18 Aa	28,03 Bb	26,96 Ba	1,98	1,43
C	31,69 Aa	30,57 Aa	28,69 Ba	2,11	1,60
	Pré-esterilização	---	Pós-esterilização		
D	28,82 Ab	---	27,05 Ba	1,05	0,66
Média (%)	31	28,86	27,58		
CV (%)	1,60	2,77	2,94		
DMS	1,29	2	2,12		

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

DMS: Diferença mínima significativa.

CV: Coeficiente de variação.

A diminuição significativa da hemicelulose no composto D depois do processo de esterilização pode ser justificada pela hidrólise causada pelo calor úmido a esse componente. Garrote et al. (1999) e Santos (2013) em seus estudos sobre processos hidrotérmicos em materiais lignocelulósicos, inclusive na palha de cana, concordam que tratamentos térmicos entre 150 e 240°C solubilizam grande parte da hemicelulose. O tratamento empregado no presente experimento atingiu apenas 121°C por 2 horas durante o processo de autoclavagem, mas pode ter sido o fator responsável pela diminuição dessa fibra no composto.

Na Tabela 18, têm-se os teores (%) de lignina, celulose e hemicelulose encontradas nos compostos ao final da Fase III. No geral, a linhagem POS 13/001 conferiu aos compostos teores menores de lignina do que a linhagem POS 09/101, porém houve diferença significativa entre as linhagens apenas no composto B e C.

O composto C, obtido por 2 dias de compostagem, assim como o composto D (axênico), apresentaram maiores teores de celulose e hemicelulose, ao final da Fase III, em relação aos compostos obtidos por 4 e 6 dias de compostagem (Tabela 18).

Os compostos submetidos a 4 (composto B) e 6 (composto A) dias de compostagem apresentaram menores teores para celulose e hemicelulose ao final da Fase III independente da linhagem utilizada (Tabela 18). Além disso, fazendo uma comparação apenas entre os compostos, foram esses dois (A e B) que apresentaram os melhores resultados para eficiência biológica. Sugere-se, então, uma hipótese de que esses dois períodos de compostagem podem ter feito com que o consumo desses nutrientes pelo *P. ostreatus* fossem estimulados. No entanto, essa hipótese precisa ser avaliada por outras pesquisas.

Isikhuemhen et al. (2009), em trabalho sobre atividade enzimática e degradação da lignina, celulose e hemicelulose por *P. ostreatus* em compostos esterilizado à base de palha de trigo e resíduos de biodigestores, encontraram uma correlação positiva entre a degradação da celulose e hemicelulose com a eficiência biológica, sendo que para a lignina essa correlação foi negativa. No presente trabalho também foi observado que a maior redução dos teores de celulose e hemicelulose ao final da Fase III ocorreu nos tratamentos que apresentaram as melhores eficiências biológicas, enquanto que para lignina isso não foi observado.

Tabela 18. Teores de lignina, celulose e hemicelulose nos compostos ao final da Fase III.

Composto ⁽¹⁾	Teor de lignina (%)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	3,90 Aa	4,32 Ab
B	4,09 Ba	4,90 Aab
C	3,96 Ba	5,67 Aa
D	4,36 Aa	4,54 Ab
Média (%)	4,46	
CV (%)	9,83	
DMS	1,02 [¥]	0,76 [£]
	Teor de celulose (%)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	19,45 Ab	21,16 Ab
B	20,74 Ab	20,41 Ab
C	26,28 Aa	26,60 Aa
D	26,74 Aa	28,03 Aa
Média (%)	23,67	
CV (%)	4,95	
DMS	2,74 [¥]	2,03 [£]
	Teor de hemicelulose (%)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	13,17 Ac	13,82 Ac
B	14,39 Abc	14,38 Ac
C	15,57 Bab	18,94 Aa
D	15,77 Ba	16,87 Ab
Média (%)	15,36	
CV (%)	3,74	
DMS	1,34 [¥]	0,99 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (3 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos)

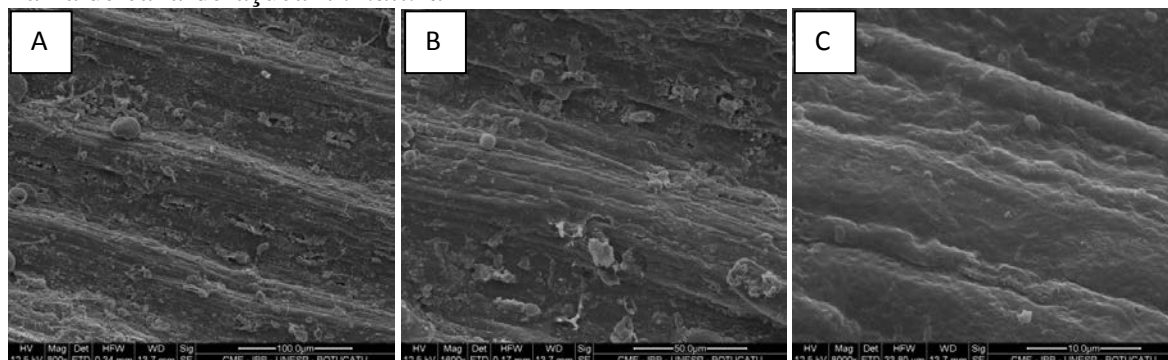
[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens)

CV: Coeficiente de variação.

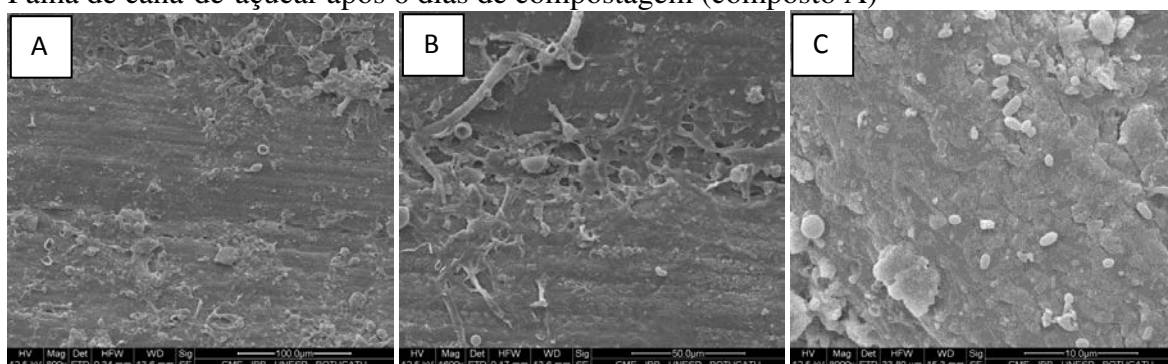
4.1.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 13, têm-se as micrografias da palha de cana *in natura* e ao final da Fase I para todos os tempos de compostagem (2, 4 e 6 dias). Observando as micrografias da palha *in natura*, nota-se que a superfície da primeira camada da palha está íntegra e, embora haja a presença de micro-organismos, esses estão, em relação às micrografias do final da Fase I, em menor número (Figura 13).

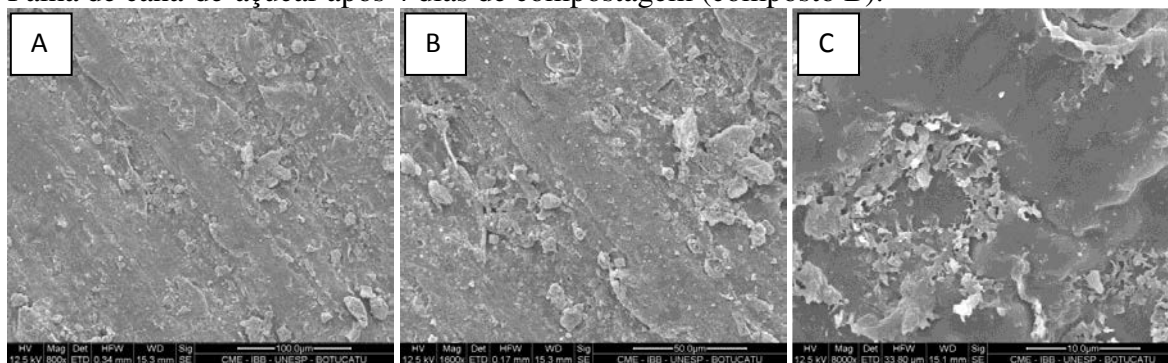
Palha de cana-de-açúcar *in natura*



Palha de cana-de-açúcar após 6 dias de compostagem (composto A)



Palha de cana-de-açúcar após 4 dias de compostagem (composto B).



Palha de cana-de-açúcar após 2 dias de compostagem (composto C)

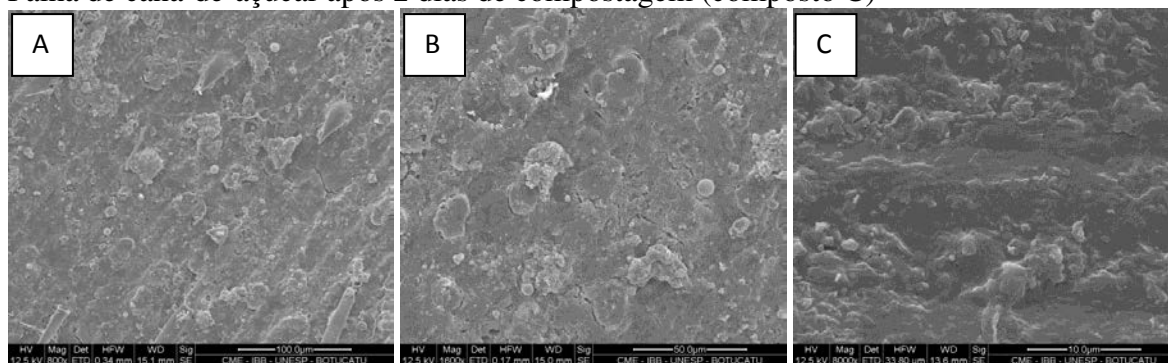


Figura 13. Micrografias da palha de cana-de-açúcar *in natura* e ao final da Fase I. Magnitude: A- 800 X, B - 1600X e C - 8000X.

Entre as palhas submetidas à compostagem encontraram-se regiões mais danificadas nos compostos A e B, com 6 e 4 dias de compostagem, respectivamente, devido ao maior tempo de ação enzimática sobre a estrutura lignocelulósica. No composto C, com apenas 2 dias de compostagem, foi observado menor número de micro-organismos e, conseqüentemente, menos danos físicos na superfície da palha (Figura 13). Essas diferenças estruturais, ocasionadas pela ação microbiana durante a compostagem, são devidas, principalmente, às reduções significativas do teor de hemicelulose encontradas para os compostos A e B na Fase I; enquanto que o composto C não apresentou redução significativa para tal nutriente nessa Fase (Tabela 17).

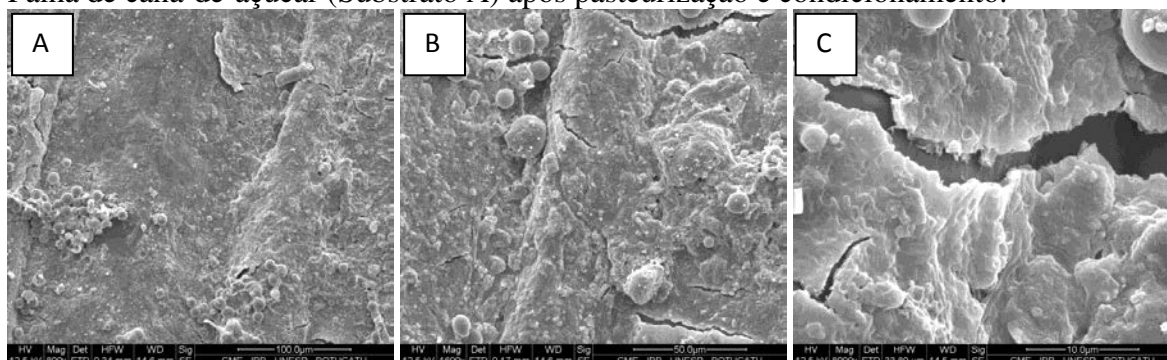
Na Figura 14, têm-se fotos da palha de cana após as etapas de pasteurização e condicionamento. Nos substratos A, B e C foi possível visualizar fendas, que são resultado da fragilidade da estrutura da palha em consequência da degradação provocada por micro-organismos decompositores. Foi observada também a presença de outros tipos de micro-organismos antes não visualizados ao final da Fase I, possivelmente fungos ou bactérias filamentosas. As fendas presentes nas palhas dos substratos A e B são mais profundas do que as encontradas no substrato C, isso pode ser resultado do maior tempo de compostagem (6 e 4 dias, respectivamente) a que foram submetidos esses dois substratos durante a Fase I. No caso, tal fenômeno traz para as etapas de pasteurização e condicionamento uma palha mais degradada e, conseqüentemente, mais seletiva à colonização por diferentes tipos de micro-organismos, pois existe um maior número de micro-organismos esféricos presentes nos substratos A e B, conforme pode ser visto nas micrografias com amplitude de 800 X e 1600 X.

Sugere-se a hipótese de que essas fendas possam facilitar a entrada das hifas e, conseqüentemente, o processo de colonização do *P. ostreatus* var. Florida atuando, assim como relatado por Aguiar e Ferraz (2011), como decompositor de materiais lignocelulósicos, excretando metabólitos que degradam a lignina, a celulose e a hemicelulose da parede celular, entre outros componentes, além de atingir posteriormente o lúmen celular do tecido vegetal morto.

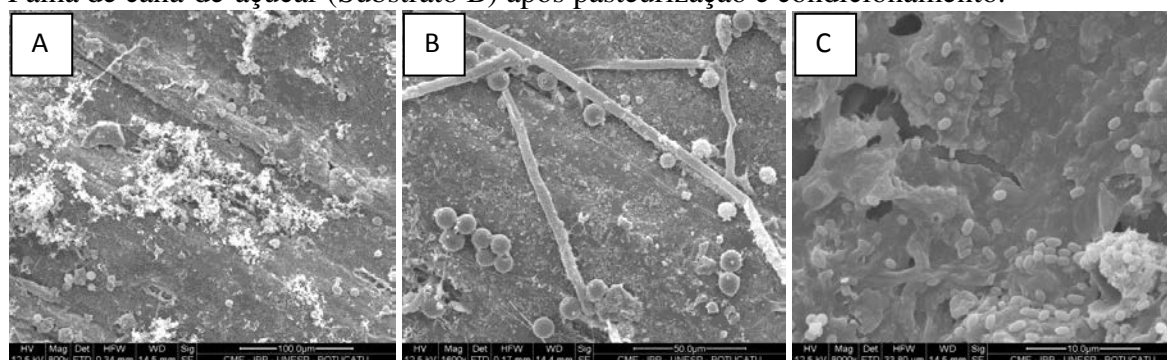
Silva (2013) trabalhou com a identificação de bactérias e actinobactérias na Fase II de compostagem no cultivo de *Agaricus brasiliensis*. Para isso, utilizou métodos físicos, químicos, genéticos (extração de DNA cromossomal) e microscopia óptica e de varredura. Concluiu que os gêneros *Thermoactinomyces* e *Streptomyces* predominam durante essa fase de preparo do composto. Através da

microscopia de varredura a autora retratou e posteriormente descreveu o gênero *Thermoactinomyces*. Esse apresentava esporos esféricos próximo das hifas. A imagem e a descrição apresentada no trabalho de Silva (2013) são semelhantes às obtidas nesse trabalho ao final da Fase II; portanto, existe a possibilidade dos micro-organismos aqui retratados pertencerem ao gênero *Thermoactinomyces*, principalmente visualizados nas figuras 18B e 19B, que correspondem aos compostos com A e B, respectivamente.

Palha de cana-de-açúcar (Substrato A) após pasteurização e condicionamento.



Palha de cana-de-açúcar (Substrato B) após pasteurização e condicionamento.



Palha de cana-de-açúcar (Substrato C) após pasteurização e condicionamento.

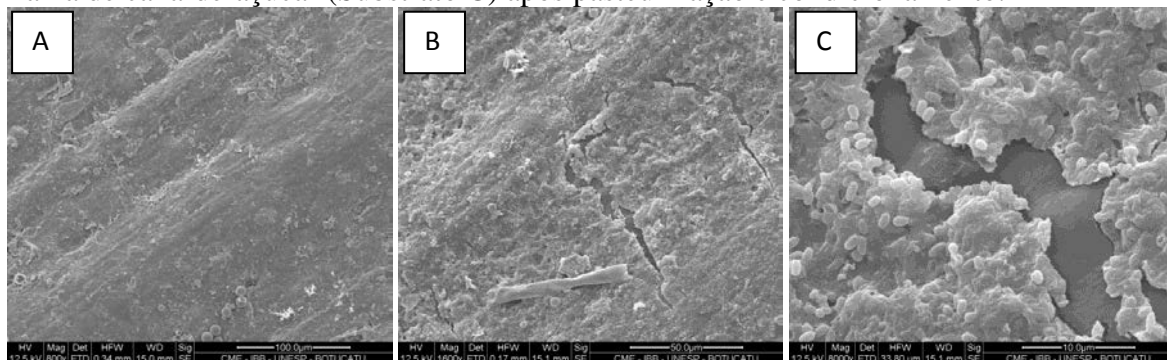


Figura 14. Micrografia da palha de cana-de-açúcar ao final da Fase II (pasteurização e condicionamento). Magnitude: A - 800X, B - 1600X, C - 8000X.

Na Figura 15, têm-se as micrografias da palha de cana-de-açúcar após a etapa de autoclavagem. Essas micrografias mostram que, embora o processo de esterilização também tenha causado rupturas e erupções na camada superficial da palha, assim como ocorreu na palha após a pasteurização e o condicionamento, essas foram menores em número, espessura e profundidade. Ademais, a presença de micro-organismos foi também visivelmente menor.

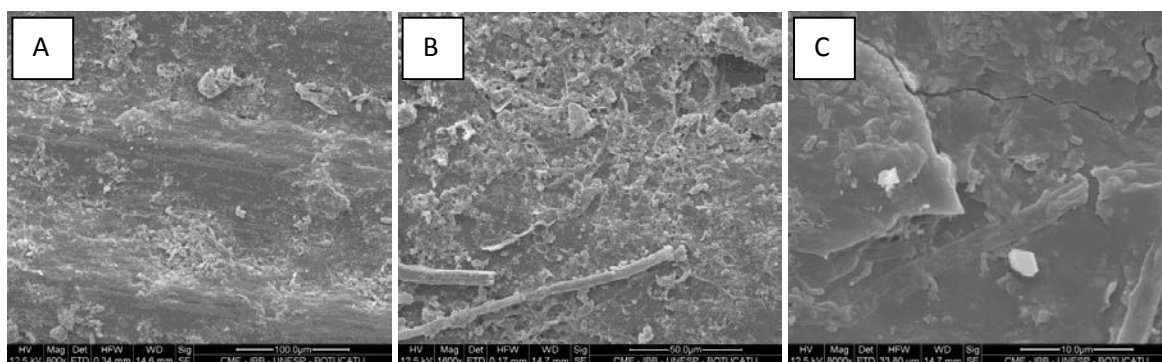


Figura 15. Micrografia da palha de cana (Substrato D) após a esterilização em autoclave (121°C, 1 atm, por 2 horas). Magnitude: A - 800X, B - 1600X e C - 8000X

4.1.2. Relativos à produção

4.1.2.1. Período de incubação, número e massa dos basidiomas

Na Tabela 19, têm-se as médias, por tratamento, encontradas para o período de incubação (do dia da inoculação até o início da colheita, em dias), número de cachos por furo (sendo 24 furos nas unidades obtidas por compostagem seguida de pasteurização e condicionamento e 3 furos para as unidades obtidas por esterilização) e massa média dos cachos colhidos durante o prazo de 45 dias, a partir da primeira colheita, com cinco picos de produção.

Entre os compostos pasteurizados, o tratamento T6, formado pelo composto C inoculado com a linhagem POS 09/101, obteve o menor tempo de incubação com 15,12 dias em média para o início da colheita, porém esse não foi um fator decisivo que tenha lhe conferido as melhores eficiência biológica e produtividade. Em contrapartida, o tratamento T1, formado pelo composto A inoculado com a linhagem POS 13/001, apresentou o maior tempo de incubação, com 22,4 dias em média, o que também não lhe conferiu as melhores eficiência biológica e produtividade (Tabela 19).

Tabela 19. Médias de período de incubação (dias), número de cachos colhidos por furo e massa média dos cachos (g), em função do tipo de composto e linhagem.

Composto ⁽¹⁾	Período de incubação (dias)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	22,40 Aa ⁽²⁾	19,60 Bb
B	19,00 Ab	16,60 Bc
C	18,60 Ab	15,12 Bd
D	22,96 Aa	23,08 Aa
Média	19,67	
CV (%)	6,13	
DMS	0,88 [¥]	0,67 [£]
	Número de cachos por furo ⁽³⁾	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	1,55 Bb	1,85 Aa
B	1,59 Bb	1,81 Aab
C	1,50 Ab	1,55 Ab
D	2,01 Aa	1,98 Aa
Média	1,73	
CV (%)	20,70	
DMS	0,26 [¥]	0,20 [£]
	Massa média dos cachos colhidos (g)	
	Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101
A	49,68 Aa	47,98 Aa
B	53,10 Aa	48,31 Aa
C	53,24 Aa	50,16 Aa
D	36,97 Ab	40,15 Ab
Média	47,45	
CV (%)	19,82	
DMS	6,89 [¥]	5,24 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (25 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

(3) As unidades (repetições) obtidas pelos processos de compostagem seguido de pasteurização e condicionamento continham 24 furos em “zigue-zague” e 8kg de composto nos sacos plásticos. As unidades obtidas pelo processo de esterilização em autoclave continham 3 furos em “zigue-zague” e 1kg de composto nos sacos plásticos.

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos)

[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens)

CV: Coeficiente de variação.

O composto D, axênico, referente à linhagem POS 09/101, apresentou um significativo período menor de incubação em relação à linhagem POS 13/001 (Tabela 19). Portanto, a linhagem POS 09/101 tem a vantagem de iniciar mais

rápido a produção de cogumelos do que a linhagem POS 13/001. Dessa maneira, a precocidade, embora seja um fator importante quando se deseja comparar o desempenho entre linhagens, não tem relação direta com a melhor produção quando se quer comparar diferentes métodos de preparo do composto.

Em relação ao número de cachos – considerando que o número de furos feitos nos sacos de substratos preparados por pasteurização e por esterilização era proporcional às massas de composto utilizadas –, o composto D (axênico) apresentou maior número de cachos colhidos por furo para ambas as linhagens: POS 13/001 com 2,01 cachos/furo e POS 09/101 com 1,98 cachos/furo, sendo que este último não apresentou diferenças significativas, em relação a esse fator, aos demais compostos. Quando esse fator é comparado entre as linhagens, observou-se que a linhagem POS 09/101 apresentou um significativo número maior de cachos colhidos por furo em relação à linhagem POS 13/001 nos compostos A e B (Tabela 19). Portanto, o número de cachos colhidos por furo ajudou os tratamentos T2 (composto A) e T4 (composto B), ambos com a linhagem POS 09/101, a obterem os melhores resultados para eficiência biológica e produtividade.

Em contrapartida ao maior número de cachos colhidos por furo, apresentados pelas linhagens no composto D (axênico), ao analisar a “massa média dos cachos colhidos” para ambas as linhagens neste mesmo composto, nota-se que essas foram menores quando comparadas às massas obtidas para os demais tratamentos, conforme apresentado na Tabela 19. Esse fator foi o responsável pelo baixo desempenho apresentado pelo composto D, quando comparado aos demais tratamentos, para ambas as linhagens.

Para o fator dias de incubação, quando analisado por composto (Figura 16), observa-se que o composto com mais dias de compostagem proporciona um maior tempo de incubação (21 dias); o mesmo resultado é encontrado no composto D, preparado por esterilização, que na média apresentou 23 dias de incubação.

Quando o período de incubação é analisado por linhagem (Figura 16), verifica-se que a linhagem POS 09/101 apresentou tempo de incubação (18,57 dias) significativamente menor do que o tempo de incubação apresentado pela linhagem POS 13/001 (20,77 dias). Fator que provavelmente também ajudou a linhagem POS 09/101 a obter melhores resultados tanto para eficiência biológica quanto para produtividade. Vieira (2012) relata que as linhagens de *P. ostreatus* (POS 09/100, POS 09/101 e POS 09/102) tiveram maior influência sobre os resultados para o período de incubação do que as diferentes formulações para os compostos utilizados pelo autor. No entanto, o presente

trabalho registrou que tanto a linhagem como os diferentes modos de preparo do composto apresentaram influência sobre o período de incubação.

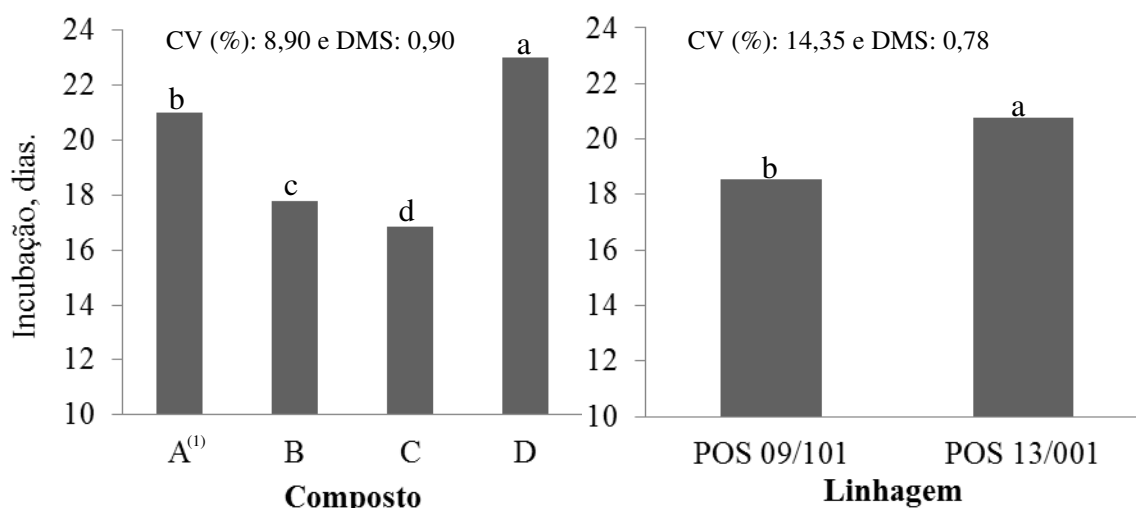


Figura 16. Período de incubação por substrato e período de incubação por linhagem. Letras iguais no topo de cada barra indicam que não diferem entre si (Tukey 5%). (1): compostos preparados com a mesma formulação à base de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo, porém, com diferentes tempos de Fase I: A (6 dias), B (4 dias), C (2 dias) e D (axênico).

Ao contrário do que mostram os resultados deste experimento, Buah et al (2010) encontraram uma relação positiva entre período de incubação, número de cachos colhidos e eficiência biológica no cultivo de *P. ostreatus* em compostos esterilizados à base de serragem e/ou sabugo de milho. Ou seja, o tratamento com menor tempo de incubação (27 dias) proporcionou maior número de cachos colhidos (28 cachos) e a maior eficiência biológica (91,21%).

4.1.2.2. Produtividade e eficiência biológica

Na tabela 20, têm-se as médias, por tratamento, para eficiência biológica (porcentagem do peso dos cogumelos frescos colhidos em relação ao peso seco do substrato) e produtividade (porcentagem do peso dos cogumelos frescos colhidos em relação ao peso úmido do substrato) por fluxo de colheita (5 fluxos de 9 dias cada, totalizando 45 dias de produção) e total da produção.

Ambas as linhagens, quando inoculadas no composto axênico, apresentaram resultados menos satisfatórios para eficiência biológica total nas condições de cultivo rústicas as quais foram submetidas neste experimento. Apenas a linhagem POS

09/101 inoculada no composto C, com 2 dias de compostagem, não apresentou diferença em relação a essa mesma linhagem inoculada no composto D (axênico) (Tabela 20). Isso pode ser explicado pela menor concentração de proteína bruta e maior relação C/N encontradas nesses compostos (C e D) após o tratamento térmico (Tabela 11).

Tabela 20. Eficiência biológica e produtividade das linhagens por fluxo e total da colheita, em função do preparo de composto. (continua)

Composto ⁽¹⁾	Eficiência biológica		Produtividade	
	Linhagens		Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101	POS 13/001	POS 09/101
FLUXO 1				
A	28,13 Ba ⁽²⁾	47,54 Aa	6,75 Ba	11,41 Aa
B	33,98 Ba	43,10 Aab	8,49 Ba	10,77 Aa
C	30,68 Ba	37,45 Abc	8,13 Ba	9,92 Aa
D	25,95 Aa	32,40 Ac	7,41 Ba	9,89 Aa
Média (%)		34,90		9,01
CV, (%)		33,97		33,98
DMS	8,69 [¥]	6,61 [£]	2,26 [¥]	1,72 [£]
FLUXO 2				
A	14,78 Ba	25,10 Aa	3,54 Bab	6,02 Aa
B	18,80 Aa	20,75 Aa	4,70 Aa	5,19 Aa
C	16,33 Aa	20,68 Aa	4,33 Aa	5,48 Aa
D	7,52 Ab	7,37 Ab	2,15 Ab	2,25 Ab
Média (%)		16,42		4,21
CV (%)		59,21		62,58
DMS	7,12 [¥]	5,42 [£]	1,93 [¥]	1,46 [£]
FLUXO 3				
A	24,99 Aa	18,88 Ba	6,00 Aa	4,18 Bbc
B	21,48 Aa	20,17 Aa	5,37 Aa	5,04 Aab
C	20,81 Aa	10,94 Bb	5,51 Aa	2,90 Bc
D	25,19 Aa	22,12 Aa	7,20 Aa	6,75 Aa
Média (%)		20,58		5,37
CV (%)		49,48		52,48
DMS	7,46 [¥]	5,79 [£]	2,06 [¥]	1,57 [£]
FLUXO 4				
A	10,60 Aa	9,41 Aa	2,54 Aa	2,26 Aa
B	13,50 Aa	9,54 Aa	3,37 Aa	2,38 Aa
C	10,00 Aa	10,94 Aa	2,65 Aa	2,90 Aa
D	9,25 Aa	7,25 Aa	2,64 Aa	2,21 Aa
Média (%)		10,06		2,62
CV (%)		75,35		78,35
DMS	5,56 [¥]	4,23 [£]	1,50 [¥]	1,14 [£]

(conclusão)				
Composto ⁽¹⁾	Eficiência biológica		Produtividade	
	Linhagens		Linhagens	
	POS 13/001	POS 09/101	POS 13/001	POS 09/101
FLUXO 5				
A	16,12 Aa	8,55 Ba	3,87 Aa	2,05 Ba
B	12,82 Aab	9,29 Ba	3,20 Aab	2,32 Ba
C	11,15 Abc	9,07 Aa	2,95 Aab	2,40 Aa
D	8,34 Ac	7,27 Aa	2,38 Ab	2,22 Aa
Média (%)	10,33		2,67	
CV (%)	51,60		53,52	
DMS	3,90 [¥]	2,97 [£]	1,05 [¥]	0,79 [£]
TOTAL				
A	94,34 Ba	108,91 Aa	22,71 Ba	26,22 Aa
B	94,88 Ba	102,49 Aa	23,80 Ba	25,72 Aab
C	88,99 Aa	88,85 Ab	23,58 Aa	23,61 Abc
D	77,36 Ab	82,81 Ab	22,02 Aa	23,34 Ac
Média (%)	92,33		23,87	
CV (%)	12,13		12,19	
DMS	8,21 [¥]	6,25 [£]	2,13 [¥]	1,62 [£]

(1) Compostos preparados com palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, gesso, calcário calcítico e água. A, B e C: compostos obtidos por 6, 4 e 2 dias de compostagem, respectivamente, seguidos de pasteurização e condicionamento. D: composto obtido por esterilização.

(2) Médias (25 repetições) seguidas de letras minúsculas iguais dentro da mesma coluna e letras maiúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem entre si (Tukey 5%).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores da mesma coluna (comparação entre compostos)

[£] Diferença mínima significativa para os valores da mesma linha (comparação entre linhagens)

CV: Coeficiente de variação.

Devido ao maior tempo de ação microbiana sobre os ingredientes do composto para os tratamentos com 6 e 4 dias de compostagem, esses tiveram, como resultados, maior estreitamento da relação C/N e maior aumento da concentração do teor de proteína bruta. Tais resultados podem ser explicados pela perda de carbono na forma de CO₂ durante o processo de compostagem, concordando com as explicações também apresentadas por Varnero et al. (2010), o que reduz a quantidade de nutrientes ricos em carbono, como a lignina, celulose e hemicelulose, e concentra o teor de componentes ricos em nitrogênio. Por esse motivo, tais compostos apresentaram os melhores resultados para eficiência biológica e produtividade. Vieira (2012) verificou que a suplementação do composto e a consequente relação C/N inicial menor aumentam a atividade microbiana e as perdas de carbono, assim como também foi constatado neste trabalho a respeito do maior tempo de compostagem.

Nos tratamentos obtidos por via axênica não houve ação microbiana, fator que deixou a relação C/N entre o início e o final do preparo do substrato praticamente inalterada (Figura 12). No entanto, Siqueira et al. (2012) não obtiveram diferenças significativas para eficiência biológica (EB) e produtividade (P) entre compostos esterilizados (P: 20,5% e EB: 59,52%) e compostos obtidos por compostagem seguida de pasteurização (P: 21,08% e EB: 61,75%) no cultivo do *P. ostreatus*, utilizando uma mesma formulação de composto e uma única linhagem.

Analisando os parâmetros de produção (Tabela 20) como instrumento de tomada de decisão para um produtor de composto, esse escolheria trabalhar com a linhagem POS 09/101 inoculada em um composto submetido a 6 ou 4 dias de compostagem seguido de 8 horas de pasteurização a vapor ($60 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e 72 horas de condicionamento ($48 \pm 2^{\circ}\text{C}$), pois foram os tratamentos que apresentaram os resultados mais satisfatórios para produtividade e eficiência biológica. No entanto, se o produtor desejar ou se já trabalhar com a linhagem 13/001 e não quiser mudar e, além disso, utilizar como método de preparo do seu composto a compostagem seguida de pasteurização e condicionamento, não faria diferença, em relação à produção de cogumelos total, a escolha entre 2, 4 e 6 dias de compostagem.

O melhor desempenho da linhagem POS 09/101, em relação à linhagem POS 13/001, é devido às melhores eficiência biológica e produtividade dessa linhagem no primeiro e segundo fluxos de colheita do composto preparado com 6 dias de compostagem e, no primeiro fluxo do composto com 4 dias de compostagem (Tabela 20). O composto D (axênico) apresentou menor eficiência biológica e produtividade no segundo fluxo, já o composto C, com 2 dias de compostagem, apresentou menor eficiência biológica no terceiro fluxo (Tabela 20). Portanto os compostos A e B apresentaram de maneira constante eficiências biológicas e produtividades melhores ou iguais (sem diferenças significativas) para a linhagem POS 09/101, em todos os fluxos no período de 45 dias de produção. Além disso, o maior consumo de massa fresca de substrato durante o cultivo, o menor período de incubação e o maior número de cogumelos produzidos por essa linhagem são apontados como fatores desse melhor desempenho.

Vieira et al. (2013) avaliaram a influência de dois tempos de Fase I (7 e 14 dias) em compostos à base de palha e bagaço de cana-de-açúcar, com e sem condicionamento na Fase II, no cultivo do *P. ostreatus* var Florida. Embora os resultados tenham mostrado maior produtividade para os cogumelos cultivados no composto

submetido ao maior tempo de compostagem com condicionamento (23,99%) em relação ao menor tempo de compostagem sem condicionamento (19,51%), as diferenças encontradas não foram significativas tanto para produtividade como para eficiência biológica e número de cachos colhidos.

Outros estudos, que utilizaram linhagens diferentes das apresentadas neste trabalho e com maiores períodos de tempo na Fase I de compostagem, devem ser conduzidos para melhor analisar a influência sobre a produtividade e eficiência biológica do *P. ostreatus*. Assim como podem ser realizados mais estudos sobre a influência do tempo e do modo de se conduzir a Fase I de compostagem correlacionando tais fatores à presença de micro-organismos no composto ao final da Fase II e sua interação com o *P. ostreatus*.

4.1.3. Relativos ao ambiente de cultivo

O *P. ostreatus* Var. Flórida é sensível às condições do ambiente externo, portanto, quando cultivado em locais rústicos, como é o caso da presente trabalho, a sua produtividade e eficiência biológica ficam intimamente relacionadas com as variáveis ambientais, tais como a umidade relativa e a temperatura. A umidade relativa do ar no interior da sala de cultivo durante este experimento variou entre 40% e 96%. A Figura 17 apresenta as temperaturas máximas e mínimas do ambiente, assim como a quantidade (em massa) de cogumelos colhidos diariamente por linhagem.

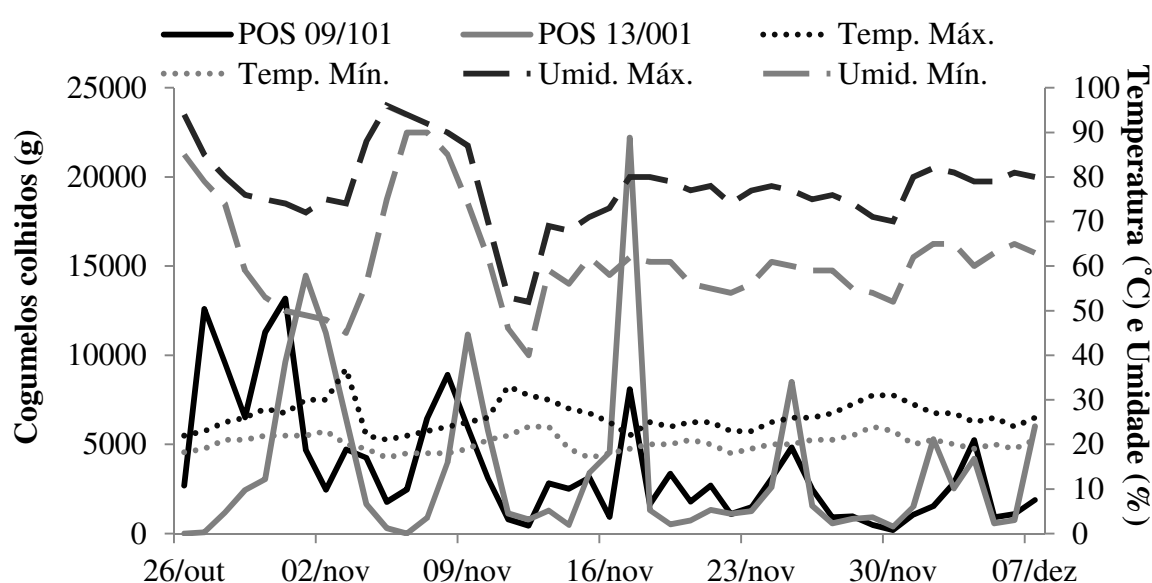


Figura 17. Colheitas por linhagem e temperaturas diárias registradas.

A temperatura mais alta aferida durante os ciclos de colheitas foi de 37°C e a mais baixa de 17°C. Observando as linhas que representam as colheitas diárias, verifica-se um comportamento semelhante entre as linhagens POS 13/001 e POS 09/101. Para ambas houve cinco picos de colheitas que foram precedidos (cerca de 3 dias antes) por uma queda na temperatura. Fato que reforça o conhecimento de que, após a colonização do substrato, o fungo precisa de um fator de estresse para produzir cogumelos, e um dos principais fatores para essa indução da frutificação, concordando com o trabalho de Figueiredo et al. (2014), é a redução da temperatura.

5. CONCLUSÃO

O tempo de Fase I e as vias de preparo do composto (axênico x pasteurizado), decorrente das mudanças físico-químicas do mesmo, influenciaram a eficiência biológica e a produtividade da linhagem POS 09/101, fato não observado, contudo, na linhagem POS 13/001.

A linhagem POS 09/101 obteve melhor eficiência biológica e produtividade, em relação à linhagem POS 13/001, nos compostos preparados com 6 e 4 dias de compostagem.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. São Paulo, **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

ALANANBEH, K. M.; BOUQELLAH, N. A.; AL KAFF, N. S. Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 616-625, Dec. 2014.

ALI, M. A.; MEHMOOD, M. I.; NAWAZ, R.; HANIF, M. A.; WASIM, R. Influence of pasteurization methods on the yield of oyster mushroom (*Pleurotus species*). Faisalabad, **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 44, n. 2, p. 300–303, 2007.

AZEVEDO, J. L.; ESPÓSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J.; MERHAUTOVA, V.; VALASKOVA, V. Degradation of lignocelluloses by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. Prague (Czech Republic), **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 670–676, Apr. 2005.

BUAH, J. N.; VAN DER PUIJE, E. A.; BEDIAKO, E. A.; SHOWEMIMO, F. The growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. Cape Coast (Ghana), **Biotechnology**, Asian Network for Scientific Information, v. 3, p. 338-342, 2010.

CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M.; NUSSIO, L. G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135 p.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. São Paulo, **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2^a ed. Campinas: Unicamp, 2003. 208 p.

CONCEIÇÃO, T. A. **Estudo da produção de enzimas lignolíticas por fungos agaricomycetes cultivados em resíduos agroindustriais do estado da Bahia**. 2010, 80 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2010.

COOPER, M.; MORATO, R. W.; REIA, M. Y.; ZANON, A. R. Compostagem e reaproveitamento de resíduos orgânicos agroindustriais: teórico e prático. **Série produtor rural: edição especial**. Piracicaba: DIBD-ESALQ/USP, 2010. 35 p.

DAS, N.; MUKHERJEE, M. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. Durgapur (India), **Bioresources Technology**, v. 98, n. 14, p. 2723-2726, Oct. 2007.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. Lavras, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss. *Heinemann* ou *Agaricus brasiliensis*** (Wasser et al.). Viçosa: AFE, CPTI, 2003. 398 p.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, 2000. Mogi das Cruzes, SP. **Resumo...** Mogi das Cruzes, 2000. p. 71-81.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual de cultivo do “Hiratake” e “Shimeji” (*pleurotus spp*)**. Botucatu: FEPAF, UNESP. 1997, 63 p.

FANADZO, M.; ZIREVA, D. T.; DUBE, E.; MASHINGAIDZE, A. B. Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 19, p. 2756-2761, 2010.

FIDALGO, O.; GUIMARÃES, S. A situação do cogumelo comestível no Brasil e no exterior. In: ENCONTRO NACIONAL DE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 1985, Mogi das Cruzes (SP). **Anais...** Mogi das Cruzes: Instituto de Botânica, 1985. p. 7-23.

FIGUEIREDO, V. R.; DIAS, E. S. Cultivo do champignon em função da temperatura. Santa Maria, **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, p. 241-246, fev. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Production de produits alimentaires et agricoles. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/Desktop Default.aspx? PageID =339&lang=es>>. Acesso em: 01 jun. 2014.

GARBOSA, F. G.; TRINDADE, J. L. Bioconversão de resíduos agroindustriais - uma revisão. In: V Setal - Semana de Tecnologia em Alimentos, 2007, Ponta grossa. V Setal - Semana de Tecnologia em Alimentos, 2007. v. 2. p. 1-8.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

GAUDETTE, H. E.; FLIGHT, W. R.; TONER, L.; FOLGER, D. W. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 44, n. 1, p. 249-253, 1974.

GERRITS, J. P. G.; AMSING, J. G. M.; STRAATSMA, G. Vochtgehalt em volumegewicht van indoor compost. **Champignon culture**, v. 41, p. 179-183, 1997.

GOLDSTEIN, J.; NEWBURY D. E. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**: A text for biologist, Materials Scientist and Geologists. New York, 2nd ed. Plenum Press, 1992.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. F. **Análises físico-químicas de alimentos**. Viçosa: UFV, 2012. 303 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Localização da sede. Botucatu, SP. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmin=350750>>. Acesso em: 01 out. 2012.

KOPYTOWSKY FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murril) Heinemann em diferentes condições de cultivo**. 2006, 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.

LAJOLO, F. M. **Fungos como alimentos**. São Paulo, Polígono. 1970. p.113-124.

LOPES, F. F. M.; ARAUJO, G. T.; LUNA, S.; NASCIMENTO, J. W. B.; SILVA, V. R. Modificação das propriedades das fibras de curauá por acetilação. *Campina Grande, Agriambi*, v. 15, n. 3, p. 315-321, mar. 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. ver. ampl. Jaguariúna. EMBRAPA Meio Ambiente. 2008, 647 p.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. **Fungos fitopatogênicos**. Recife, PE: UFRPE.1993, p.227.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Mushroom biology** - Concise basics and current developments. London: World Scientific. 1997, 177 p.

MILEO, P. C. **Aplicações da celulose da palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo da celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2011, 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2011.

MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Produção de micélio, Spawn ou “semente” para o cultivo de cogumelos. In. SICOG – Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, 4, 2008, Caxias do Sul. **Anais...**Caxias do Sul: Embrapa, 2008. p. 48–57.

NEVES, I. P. Compostagem (Dossiê Técnico). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas–RETEC/BA, 2007. Disponível em: <http://sbrtv1.ibict.br/upload/dossies/sbirt_dossie130.pdf?PHPSESSID=570a382e6a15b735f3a58066c0fcfde>. Acesso em: 11 nov. 2012.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3rd. ed. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. 429 p.

ISIKHUEMHEN, O. S.; MIKIASHVILLI, N. A. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. **J. Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 11, p. 1353-1362, July 2009.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007, 142 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

ROLLAN, G. M. **Cultivo de setas y trufas**. Madri: Mundi-Prensa, 2003. 239 p.

SALES CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Análise físico-química e composição nutricional da matéria-prima e de substratos pré e pós-cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Interciência**, v. 35, n. 1, p. 70-76, jan. 2010.

SALMAN, A. K. D.; FERREIRA, A. C. D.; SOARES, J. P. G.; SOUZA, J. P. Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. EMBRAPA, 2010. Disponível em: <http://www.cpafr.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/doc136_alimentacaodruminantes.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2014.

SANCHES, E. M. S.; CAVANI, C. S.; LEAL, C. V.; SANCHES, C. G. Compósito de resina de poliéster insaturado com bagaço de cana-de-açúcar: influência do tratamento das fibras nas propriedades. Campinas, **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 194-200, 2010.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓS, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol. São Paulo, **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013, 94 f. Tese (Doctor Scientiae). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2013.

SILVA, L. C. B. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. Isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010, 70 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

SILVA, E. G.; DIAS, E. S.; SIQUEIRA, F. G.; SCHWAN, R. F. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. Campinas, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v. 27, n. 1, p. 72-75, mar. 2007.

SINGH, M. P. Biodegradation of lignocellulosic wastes through cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. In: **Science and cultivation of edible fungi**. v. 2. L. J. D. Van Griensven (Ed). Netherlands, 2000. p. 517 – 521.

SIQUEIRA, F. G.; MACIEL, W. P.; MARTOS, E. T.; DUARTE, G. C.; MILLER, R. N. G.; SILVA, R.; DIAS, E. S. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms in substrates obtained by short composting and steam pasteurization. **African J. of Biotechnology**, v. 11, n. 53, p. 11630-11635, July 2012.

SOUZA, E. Problemas no cultivo de *Pleurotus*. In: SICOG - Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil, 4, 2008, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Embrapa, 2008. p. 28–34.

STRAATSMA, G.; GERRITS, J. P. G.; THISSEN, T. N. M.; AMSING, J. G. M.; LOEFFEN, H.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. Wageningen (Holanda), **Bioresources Technology**, v. 72, n. 1, p. 67-74, June 1999.

VAN SOEST, P. J. New chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science**, v. 3, n. 3, p. 838-845, 1964.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the AOAC**, v. 50, p. 50-55, 1968.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Champaign, **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583- 3597, Oct. 1991.

VARNERO, M. T.; QUIROZ, M. S.; ALVAREZ, C. H. Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). La Serena (Chile), **Información Tecnológica**, v. 21, n. 2, p. 13-20, 2010.

VIEIRA, F. R.; JESUS, J. P. F.; MINHONI, M. T. A. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Shimeji branco) cultivado em composto pasteurizado com dois níveis de nitrogênio. In: SICOOG - Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, 5, 2010, Sorocaba, SP. **Resumos...** Sorocaba, SP: Universidade de Sorocaba, 2010a. v. 1. p. 4.

VIEIRA, F. R.; JESUS, J. P. F.; GUIMARÃES, G. L. O.; MINHONI, M. T. A. Avaliação do crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm em meio à base de capim braquiária e palha de cana-de-açúcar. In: SICOOG - Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, 5, 2010, Sorocaba, SP. **Resumos...** Sorocaba, SP: Universidade de Sorocaba, 2010b. v. 1. p. 3.

VIEIRA, F. R. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo pleurotus ostreatus (jacq.) p. kumm.** 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2012.

VIEIRA, F. R.; NAKACIMA, D. R.; ZANON, A. R.; ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A. The influence of fermentation time in Phase I and conditioning in the Phase II on yield of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). In: SICOOG - Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, 7, 2013, Manaus, AM. **Resumos...** Manaus, AM: Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia, 2013. v. 1. p. 311.

UEDA, S. M.; SILVA, C. B.; MIRANDA, M. A. L.; MURÇA, M. A. S.; MUNOZ, D. R.; FARIA, M. L.; VITA, R. F.; MIMICA, L. M. J. Comparação entre a microbiota da terra de cemitérios: locais virgens e locais onde são enterrados corpos. Arquivos Médicos Hospital Fac. Ciências Médicas Santa Casa São Paulo. v. 56, n. 2, p. 74-79, 2011.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada.** 2 ed. revisada e ampliada. Embrapa. Brasília, DF. 2004.